



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

LEISHMANIOSE CANINA NA ZONA DO PINHAL

António Alexandre Afonso Gonçalves Matias da Silva

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira
da Fonseca de Sampaio

Doutor José Manuel Antunes Ferreira
da Silva

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dr. Francisco Manuel Azedo Apolinário

ORIENTADOR

Dr. Francisco Manuel Azedo Apolinário

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

LEISHMANIOSE CANINA NA ZONA DO PINHAL

António Alexandre Afonso Gonçalves Matias da Silva

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Isabel Maria Soares Pereira

da Fonseca de Sampaio

Doutor José Manuel Antunes Ferreira

da Silva

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

Dr. Francisco Manuel Azedo Apolinário

ORIENTADOR

Dr. Francisco Manuel Azedo Apolinário

CO-ORIENTADOR

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

2009

LISBOA

Agradecimentos

À minha família, em especial aos meus pais, Margarida e Franklin e à minha irmã Mariana pela compreensão, o apoio e a amizade incondicional com que sempre me trataram, principalmente neste último ano, durante o qual efectuei o estágio e desenvolvi este trabalho.

Ao Dr. Francisco Apolinário, meu Orientador, pelos conhecimentos que me transmitiu, pela paciência dispendida comigo, pela abertura com que sempre abordou os problemas, pela partilha da sua experiência de vida e pela preocupação que teve em me sensibilizar para a enorme importância do estímulo do raciocínio a par do estudo.

Ao Professor Doutor Fernando Afonso, meu co-Orientador, pela disponibilidade com que sempre me acolheu, pela preocupação que demonstrou durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo e colaboração no sentido de me ajudar a ultrapassar as dificuldades que foram surgindo.

À Professora Doutora Isabel Fonseca pelos esclarecimentos técnicos fulcrais que me proporcionou, pela acessibilidade com que disponibilizou os meios técnicos necessários para a realização dos objectivos a que me propus e pela preciosa ajuda que me prestou para que num dos momentos mais difíceis da realização deste trabalho, conseguisse ter a lucidez necessária para o concluir.

Ao Professor Doutor Ferreira da Silva, pela disponibilidade e objectividade demonstrada para me ajudar no esclarecimento e correcção de ideias.

À Dra. Lídia Gomes, pela ajuda vital prestada, pela disponibilidade no tempo dispendido comigo e pelo apoio logístico na execução do trabalho desenvolvido no Laboratório de Parasitologia.

À Rita Albino, a auxiliar de consultório no local onde desenvolvi o estágio, pela cooperação, pela amizade e compreensão que sempre demonstrou e pelo incentivo à autonomia.

Ao Realizador fotográfico, Francisco Simões, pela ajuda essencial nesta componente do trabalho e por todos os conselhos construtivos que me transmitiu.

Aos meus colegas e amigos.

A ti, Rita.

Resumo

Leishmaniose canina na Zona do Pinhal

A Leishmaniose canina (LCan) é uma zoonose parasitária vectorial, em Portugal a infecção é causada por protozoários de *Leishmania infantum* e é transmitida por flebótomos. Pode infectar vários Mamíferos, inclusive o homem embora o hospedeiro vertebrado preferencial para *L. infantum* seja o cão. Actualmente não existe no mercado europeu uma vacina anti-leishmaniose. Perante um diagnóstico da infecção, uma vez que os sintomas se manifestam, na ausência de tratamento, a situação evolui para a morte. Em Portugal existem regiões endémicas da doença com elevados valores de seroprevalência. Na área geográfica onde se desenvolveu este estudo, a Zona do Pinhal, mais concretamente no Concelho da Sertã, todos os anos são diagnosticados com a infecção dezenas de cães. Este documento justifica-se, no âmbito da Medicina Veterinária pela elevada casuística da doença na população canina desta região, por aqui existirem condições favoráveis ao desenvolvimento do vector, por esta ser uma área endémica e pelo perigo que todos estes factores conjugados podem representar para a Saúde Pública. Este trabalho, recai sobre uma amostra constituída por 22 cães com sintomatologia que indicia a infecção por *Leishmania*, aos quais foram efectuadas colheitas de sangue, das quais 21 deram resultados positivos num teste de serologia qualitativa baseado em técnicas de imunodifusão – *Speed® Leish*, BVT Virbac. Um grupo de 11 amostras de sangue dos cães da amostra foi escolhido para efectuar pesquisa de anticorpos anti-leishmania com o teste de Imunofluorescência indirecta (IFI), dos quais 8 deram resultados positivos. Para que se saiba quais os valores reais da seroprevalência da infecção nos cães na Zona do Pinhal, são necessários estudos adicionais com amostras mais representativas e períodos de estudo mais longos.

Palavras-chave: Leishmaniose canina; endémica; seroprevalência; Zona do Pinhal; zoonose;

Abstract

Canine leishmaniosis in Zona do Pinhal.

Canine leishmaniosis (LCan) is a zoonotic vector-borne disease, in Portugal the infection is caused by the protozoa *Leishmania infantum* and transmitted by sandflies. Various Mammalian species can become infected, including humans, although the preferential vertebrate host for *L. infantum* is the dog. Presently there isn't in the European market an anti-leishmaniasis vaccine. In face of diagnosis of infection, as the symptoms are manifest, in the absence of treatment, the situation progresses to death. In Portugal there are geographical regions in which the disease is endemic with high levels of seroprevalence. In the geographical area where this study was developed, Zona do Pinhal, especially in the county of Sertão, every year tens of dogs are diagnosed with the infection. This document justifies itself in the Veterinary Medicine scope by the disease high rate in the canine population of this region, by the favorable conditions to the vector development existing here, because this is an endemic area and for the danger that all these factors together can represent to the Public Health. This study deals about a sample of 22 dogs with symptoms suggesting infection with *Leishmania*, from which blood samples were drawn, of which 21 were positive in a qualitative serological test based on immunodiffusion techniques – Speed® Leish, BVT Virbac. A group of 11 blood samples were chosen to perform anti-leishmania antibody search with Immunofluorescent antibody test (IFAT), of which 8 rendered positive results. In order to establish the real values of the prevalence of infection in dogs in Zona do Pinhal, additional studies are needed with more representative samples and longer study periods.

Keywords: Canine leishmaniosis; endemic; seroprevalence; Zona do Pinhal; zoonosis;

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice Geral	IV
Índice de Figuras	VI
Índice de Gráficos	VII
Índice de Tabelas.....	VIII
Lista de Siglas	IX
Nota Prévia	1
I – Introdução	4
II – Revisão Bibliográfica.....	8
1. Caracterização dos agentes etiológicos da LCan.....	8
1.1. Taxonomia	8
1.2. Ciclo biológico e formas evolutivas	9
2. Caracterização dos vectores de <i>Leishmania</i> spp	11
3. Epidemiologia	14
4. Patogenia.....	17
5. Susceptibilidade.....	22
6. Sinais clínicos	23
7. Diagnóstico laboratorial.....	29
7.1. Alterações bioquímicas e hematológicas	29
7.2. Visualização dos parasitas por microscopia óptica.....	30
7.3. Cultura de leishmanias e xenodiagnóstico	31
7.4. Detecção de anticorpos anti- <i>leishmania</i>	31
7.5. Detecção e amplificação de DNA.....	32
7.6. Reacção de Montenegro	33
8. Diagnósticos diferenciais	34
8.1. Afecções concomitantes	37
9. Tratamento	39
9.1. Tratamento etiológico.....	39
9.1.1. Antimoniais pentavalentes	39
9.1.2. Alopurinol.....	40
9.1.3. Anfotericina B.....	40
9.1.4. Aminosidina	41
9.1.5. Pentamidina	41
9.1.6. Miltefosina.....	41
9.1.7. Imidazóis.....	42

9.1.8. Trifluralina em lipossomas.....	42
9.2. Tratamento imunomodulador	43
9.2.1. Imunosupressores.....	43
9.2.2. Imunoestimulantes	44
9.3. Tratamento de suporte.....	45
10. Profilaxia	46
10.1. Vacinas.....	46
10.1.1. Vacinas de 1ª geração	46
10.1.2. Vacinas de 2ª geração	46
10.1.3. Vacinas de 3ª geração	47
10.2. Repelentes e insecticidas para a prevenção da picada do vector	48
11. Cães errantes	49
III – Leishmaniose Canina na Zona do Pinhal	51
1. Objectivos	51
2. Material e métodos	51
2.1. Técnicas laboratoriais	51
2.1.1. Speed Leish	51
2.1.2. IFI	53
2.2. Métodos estatísticos	54
2.3. Caracterização da Amostra.....	54
2.3.1. Sexo	55
2.3.2. Idade.....	55
2.3.3. Raça	55
2.3.4. Proveniência e Habitat	56
3. Resultados.....	57
3.1. Sinais clínicos e serologia.....	57
3.2. Alterações laboratoriais.....	59
3.2.1. Alterações bioquímicas	59
3.2.2. Alterações hematológicas	60
3.3. Dados adicionais.....	61
3.3.1. Protecção repelente e insecticida.....	61
3.3.2. Tratamento, seguimento e afecções concomitantes.....	61
4. Discussão	62
5. Conclusão.....	75
6. Bibliografia	77

Índice de Figuras

Figura 1 – Radiografia da resolução duma fractura metafisária distal oblíqua da tíbia esquerda de uma cadela, utilizando um cravo de Steinmann intra-medular.....	2
Figura 2 – Mastectomia. Corte na pele para acesso ao tumor.	2
Figura 3 – Cristais de estruvite em urina de gato. Ampliação 40x.	3
Figura 4 – Radiografia da resolução de uma fractura metafisária proximal do fémur direito de um cão através da aplicação de um cravo de Steinmann intra-medular.....	3
Figura 5 – Zona do Pinhal – Localização geográfica.	5
Figura 6 – Macrófago densamente parasitado por amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. Coloração pelo método de Giemsa.	9
Figura 7 – Promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	10
Figura 8 – <i>Phlebotomus papatasi</i>	11
Figura 9 – Locais com condições propícias ao desenvolvimento de <i>Phlebotomus</i> sp. em várias localidades da Zona do Pinhal.....	12
Figura 10 – Região endémica da Bacia Mediterrânica	14
Figura 11 – Mapa da prevalência da LCan na região centro de Portugal e localização da Zona do Pinhal.....	15
Figura 12 – Alopecia da ponta da cauda.	23
Figura 13 – Alopecia no plano nasal.	23
Figura 14 – Nódulo no plano nasal.....	24
Figura 15 – Alopecia generalizada da cabeça com lesões de hiperqueratose e crostas no bordo do pavilhão auricular.....	24
Figura 16 – Úlcera prepucial.	25
Figura 17 – Onicogrifose: crescimento e curvatura exagerada das unhas.	26
Figura 18 – Onicogrifose, hiperqueratose e alopecia.	26
Figura 19 – Radiografia do tarso esquerdo exibindo sinais de artrite não erosiva com leves sinais de doença degenerativa da articulação.....	27
Figura 20 – Caquexia.....	27
Figura 21 – Aspecto do olho de um cão afectado por LCan: blefarite, conjuntivite, vascularização e edema da córnea.....	28
Figura 22 – Granuloma palpebral e hiperqueratose nasal.....	28
Figura 23 – Epistáxis	29
Figura 24 – Cães errantes da Zona do Pinhal.....	50
Figura 25 – Aspecto de um resultado positivo no <i>kit</i> de teste <i>Speed® Leish</i>	52
Figura 26 – Aspecto de um teste de IFI positivo – promastigotas fluorescentes.....	54

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Histograma de distribuição dos cães por classes etárias.	55
---	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Número de cães de determinada raça presentes na amostra.....	56
Tabela 2 – Habitat e Concelho de origem dos cães da amostra	56
Tabela 3 – Sinais clínicos manifestados por cada cão e respectivo resultado dos testes serológicos <i>Speed® Leish</i> e IFI	57
Tabela 4 – Número e percentagem de cães que manifestaram um dado sinal clínico.	58
Tabela 5 – Perfil bioquímico dos cães da amostra	60
Tabela 6 – Perfil hematológico dos cães da amostra.	61

Lista de Siglas

°C – Graus Celsius
% - Percentagem
ALT – Alanina amino-transferase
ANA's – Anticorpos anti-nucleares
AST – Aspartato amino-transferase
AT – Anti-trombina
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin, vacina contra a tuberculose
BID – A cada 12 horas
BUN – *Blood Urea Nitrogen*; Ureia
CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID – Coagulação intravascular disseminada
CMH-II – Complexo maior de histocompatibilidade Classe II
CPA – Peptidases de cisteína das leishmanias tipo II
CPB – Peptidases de cisteína das leishmanias tipo I
DAT – Teste de aglutinação directa
dl – Decilitro
DLA – Antígeno do leucócito canino
DNA – Ácido desoxirribonucleico
ELISA – *Enzyme linked immunoabsorbent assay*
EV – Via endovenosa
FAS – Fosfatase alcalina sérica
FeLV – Vírus da leucemia felina
FIV – Vírus da imunodeficiência felina
FML – Ligando fucose-manose
g – Grama
h – Horas
HIV – Vírus da imunodeficiência humana, vírus da SIDA
IECA's – Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IFAT – *Immunofluorescent antibody test*
IFI – Imunofluorescência indirecta
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL – Interleucina
IM – Via intra-muscular
INF-y – Interferão gama
IRA – Insuficiência renal aguda

IRC – Insuficiência renal crónica
ITS-1 – *Internal space transcriber 1*
kDNA – DNA do cinetoplasto
kg – Quilograma
LCan – Leishmaniose canina
LV – Leishmaniose visceral humana
L – Litro
mg – Miligrama
MO – Microscópio óptico
mRNA – RNA mensageiro
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintetase
NRAMP1 – *Natural resistance associated macrophage protein 1*
OPP – Organização de Produtores Pecuários
PCR – *Polymerase chain reaction* = reacção em cadeia da polimerase
PCR-RFLP – *PCR-restriction fragment length polymorphism* = PCR-polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição
PO – *Per os*
PT – Proteínas totais
pv – Peso vivo
RNA – Ácido ribonucleico
RT-PCR – *Real Time-PCR* = PCR em tempo real
SC – Via subcutânea
SI – Sistema imunitário
SID – A cada 24 horas
SMF – Sistema mononuclear fagocitário
Th1 – Linfócitos CD4+ T helper 1
Th2 – Linfócitos CD4+ T helper 2
TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa
UI – Unidades internacionais

Nota Prévia

O estágio realizado pelo autor foi orientado pelo Médico Veterinário Dr. Francisco Apolinário e decorreu entre 16 de Fevereiro e 25 de Maio de 2009. Durante este período e sempre sob orientação, o autor assistiu e cooperou em várias actividades do foro clínico e profiláctico, desenvolvidas pelo Orientador.

O estágio curricular foi desenvolvido na clínica veterinária SERVETCERT, sediada na vila de Cernache do Bonjardim, freguesia do Concelho da Sertã, da qual o Orientador é o director clínico e onde conta com a cooperação de uma auxiliar de consultório. O autor teve a oportunidade de assistir e participar em consultas das várias áreas da actuação clínica.

Durante o estágio foi proporcionada ao autor a oportunidade de estabelecer diálogo aberto com os donos dos pacientes com o intuito de realizar uma recolha de dados para a elaboração duma história pregressa o mais completa possível, de acompanhar e auxiliar o Orientador na realização do exame clínico, participar na realização e discussão dos diagnósticos, auxiliar na realização de exames complementares de diagnóstico, discutir a opção da terapêutica instituída e frequentemente auxiliar na sua administração.

As actividades clínicas desenvolvidas englobaram a área da Profilaxia, da Medicina Interna, dos Exames complementares de diagnóstico e da Cirurgia.

No âmbito da Profilaxia, foram efectuadas desparasitações (internas e externas) e vacinações englobadas sempre numa calendarização futura, previamente bem definida. Também neste contexto, foram feitas aos donos recomendações sobre as medidas preventivas adequadas a serem tomadas numa região endémica em LCan, a fim de evitar a infecção dos cães e sobre a importância que a tomada de tais medidas tem na prevenção da infecção dos donos e de terceiros. Nomeadamente, através da aplicação nos cães de uma solução *spot on* insecticida e repelente ou alternativamente de colares impregnados com insecticidas.

Os Exames complementares de diagnóstico realizados incluíram radiografias, análises hematológicas e bioquímicas, assim como observações ao microscópio óptico (MO) de esfregaços de sangue, de colheitas de urina, de biópsias de tumores e nódulos. A utilização de kits rápidos para a detecção de infecção por *Leishmania*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Dirofilaria*, *Parvovirus* e *Coronavirus* em cães e pelo Vírus da imunodeficiência felina (FIV), Vírus da leucemia Felina (FeLV) e *Chlamydia* em gatos foi uma prática rotineira durante o período de estágio.

A casuística da Cirurgia incluiu castrações de gatos, ovariectomias de cadelas e gatas, cesariana a uma gata, mastectomias para a remoção de tumores mamários (Figura 2), remoção de um hemangioma e de um nódulo cutâneo, várias intervenções do foro

ortopédico incluindo resolução de fracturas da tíbia (Figura 1) e do fémur (Figura 4) e o tratamento e sutura de ferimentos decorrentes de lesões traumáticas.

Figura 1 – Radiografia da resolução duma fractura metafisária distal oblíqua da tíbia esquerda de uma cadela, utilizando um cravo de Steinmann intra-medular.



Seta:Localização e orientação da linha de fractura

Figura 2 – Mastectomia. Corte na pele para acesso ao tumor.



A casuística de Medicina Interna incluiu uma panóplia de casos clínicos que está de algum modo influenciada pela prevalência de certas afecções características da região onde foi efectuado o estágio, das quais faz sentido salientar, pela frequência de apresentação, os casos de infecção por *Leishmania* em cães e por *Parvovirus* principalmente em cachorros, os casos de contacto com processionária do pinheiro (*Thaumetopoea pityocampa*), os de infestação por carraças e os de otite por corpo estranho em cães. Por outro lado, devido ao escasso número de casos, por vezes únicos, seguidos pelo autor, faz sentido fazer alusão

aos episódios de mordedura de ofídio, eclampsia e *status epilepticus* em cães e de cristalúria (Figura 3) em gatos.

Figura 3 – Cristais de estruvite em urina de gato. Ampliação 40x.



Figura 4 – Radiografia da resolução de uma fractura metafisária proximal do fémur direito de um cão através da aplicação de um cravo de Steinmann intra-medular.



Seta: Localização e orientação da linha de fractura

Além do estágio desenvolvido na clínica, o autor integrou uma brigada veterinária pertencente a uma Organização de Produtores Pecuários (OPP) da qual o Orientador é o Médico Veterinário executor. A brigada faz parte integrante da Associação de Criadores de Pequenos Ruminantes da Zona do Pinhal – ACRIPINHAL – que tem sede na Vila da Sertã. As actividades realizadas pelo autor, nesta componente do estágio, incluíram campanhas de identificação, rastreio de Brucelose e desparasitação interna em pequenos ruminantes e bovinos e vacinação contra o Vírus da Língua Azul em ovinos e bovinos nos efectivos da maioria das freguesias do município da Sertã e em explorações de Concelhos limítrofes.

Neste âmbito pôde ainda cooperar na realização de consultas na área da clínica das espécies pecuárias que incluíram casos de hipocalcémia pós-parto em caprinos, diarreia num bovino de engorda, conjuntivite num novilho, pneumonia num leitão, partos distócicos em caprinos e prestação de cuidados a ovinos, vítimas de ataques por cães.

O elevado número de casos de LCan observados pelo autor durante o estágio, os inúmeros casos diagnosticados pelo Orientador durante a última década, a constatação da falta de conhecimento demonstrada por grande parte dos proprietários sobre a doença e por esta ser uma região endémica, foram motivos de ordem técnica suficientes para pensar em fazer um rastreio numa região onde não existem dados publicados da prevalência da doença. É urgente informar sobre o risco de exposição ao vector em zonas endémicas, para que os donos possam eficazmente proteger os seus animais e com isto evitar situações crónicas e desgastantes em que se tornam muitos dos casos de LCan, não só para os fiéis amigos de quatro patas mas também para quem os ama. É urgente alertar para o perigo que a LCan representa para a Saúde Pública, e que esta doença é endémica na Zona do Pinhal.

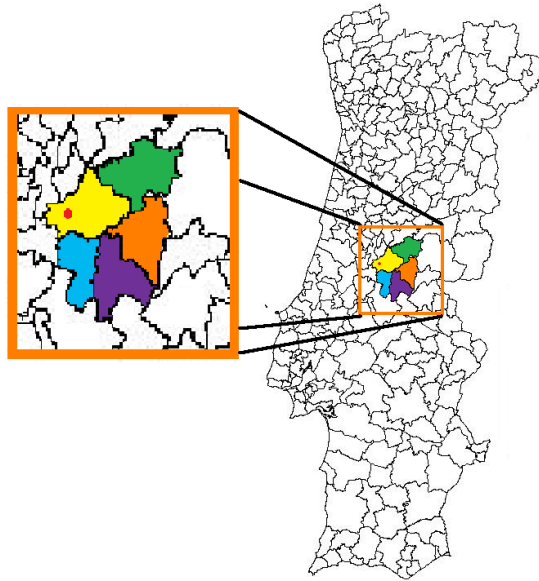
I – Introdução

A Zona do Pinhal é uma área geográfica situada na subregião do Pinhal Interior Sul. Dela fazem parte os Concelhos da Sertã, Oleiros, Vila de Rei e Proença-a-Nova, pertencentes ao Distrito de Castelo Branco e o Concelho de Mação que pertence ao Distrito de Santarém. É uma região situada no interior do centro do País (Figura 5), situando-se o centro geodésico de Portugal no Concelho de Vila de Rei. É uma região florestal onde abunda o pinheiro bravo e mais recentemente o eucalipto. O ponto mais baixo da região tem 125m de altitude enquanto o mais alto excede os 1000m. É uma região montanhosa com planaltos férteis, profundamente recortada por vales. O rio Zêzere, com as albufeiras resultantes das três barragens que o seu leito comporta (Cabril, Bouça e Castelo de Bode), delimita a região a norte, a oeste e a sudoeste. No extremo este da Zona do Pinhal é o Rio Ocreza que delimita a região e a sudeste é em parte o rio Tejo. As principais actividades do sector primário e secundário da região estão principalmente ligadas à silvicultura e agricultura havendo também alguma expressão ao nível da suinicultura, caprinicultura, ovinicultura e cinegética. Como parte componente destas actividades são muitas vezes criados reservatórios de água artificiais que a par dos muitos cursos de água naturais contribuem para a elevada humidade característica da região.

As actividades do sector secundário e terciário têm vindo a desenvolver-se há uns anos a esta parte, a construção do IC8 (Coimbra - Castelo Branco) e da A23 (Torres Novas – Guarda) ajudaram nesse aspecto, mas a população da Zona do Pinhal tem vindo a diminuir censo após censo, sendo esta uma região marcada pela emigração e pelo êxodo rural. A temperatura excede frequentemente os 30 °C nos meses de Verão e é nesta altura que há

mais movimento na região. Os que há muito (ou pouco) tempo partiram, porque para os que ficam parece sempre uma eternidade, voltam então para as merecidas férias, acompanhados das famílias que entretanto constituíram e com o cão com que falam em outros idiomas que não o português. Nas noites de Inverno, as temperaturas negativas por vezes registadas, denunciam as grandes amplitudes térmicas típicas da região.

Figura 5 – Zona do Pinhal – Localização geográfica.



Ponto encarnado – Cernache do Bonjardim (local onde foi efectuado o estudo); Áreas coloridas – Municípios que constituem a Zona do Pinhal: Amarelo – Sertão; Azul – Vila de Rei; Roxo – Mação; Laranja – Proença-a-Nova; Verde – Oleiros.

A LCan é uma zoonose parasitária, que afecta preferencialmente os canídeos. Em Portugal, o agente etiológico desta doença é o protozoário *Leishmania infantum*, que em humanos causa Leishmaniose visceral (LV). A transmissão de *L. infantum* dá-se por intermédio dum insecto vector. As espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* são os vectores comprovados que no nosso País transmitem a infecção entre hospedeiros vertebrados (Afonso, Campino, Cortes, & Alves-Pires, 2005). A doença é endémica em todos os países da bacia mediterrânica (Dujardin *et al.*, 2008), em Portugal consideravam-se três regiões de alta prevalência da infecção, as regiões endémicas do Alto-Douro, da área metropolitana de Lisboa e do Algarve. Como preocupação que é para a comunidade Médico-Veterinária, os vários estudos que têm vindo a ser efectuados permitem que o conhecimento da epidemiologia e patogenia da doença sejam no presente, bastante mais completos.

O risco de infecção humana é uma realidade que tem que ser encarada com seriedade e responsabilidade por Médicos Veterinários, profissionais de Saúde Pública, entidades governamentais, indústria farmacêutica e pelos donos dos animais porque numa região

endémica, qualquer pessoa que não tenha os conhecimentos que permitam efectuar uma protecção eficaz, corre o risco de ser infectada (Dujardin *et al.*, 2008).

O vector demonstra preferência por se alimentar em cães, por um lado porque estes se encontram mais tempo expostos ao e sem qualquer tipo de protecção, especialmente os cães de grande porte, cães de guarda, de trabalho ou de caça que passam a maioria do tempo ao ar livre ou em locais a que o vector pode aceder facilmente. Por outro lado, o sistema imunitário (SI) humano demonstra uma maior eficácia no controlo da infecção que o SI canino. No entanto, para os casos de LV, são utilizados tratamentos (por quem os pode suportar) cujos preços vedam a sua utilização na maioria dos casos de LCan. Os casos declarados de LV são observados sobretudo em crianças (daí a denominação *L. infantum*: *infantum* = criança), pessoas imunodeprimidas como pacientes infectados com o Vírus da SIDA (HIV) e idosos (Campino *et al.*, 2005).

No organismo do hospedeiro vertebrado, as leishmanias parasitam macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário, (SMF) onde se reproduzem. Quando o SI é incapaz de produzir uma resposta celular protectora, capaz de controlar a infecção, as leishmanias continuam-se a reproduzir e a disseminar pelo organismo. Estas produzem uma reacção inflamatória do tipo granulomatoso e ao mesmo tempo são produzidas grandes quantidades de anticorpos que além de não serem protectores, quando se ligam com os antigénios das leishmanias formam imunocomplexos que causam danos nos tecidos onde se depositam (Baneth, Koutinas, Gallego, Bourdeau, & Ferrer, 2008).

A LCan é uma afecção multi-sistémica que debilita o SI, predispõe a que os animais infectados sejam mais facilmente atingidos por outros agentes patogénicos. Por outro lado, animais com imunodeficiência ou imunoincompetência de várias etiologias, uma vez infectados com *L. infantum*, tornam-se animais sintomáticos mais precocemente. (Mozos, Pérez, Day, Lucena, & Ginel, 1999; Baneth, 2009c; Baneth, 2009e; Mekuzas *et al.*, 2009).

Estes factos contribuem para a multiplicidade de sintomas exibidos pelos animais infectados. A maioria dos autores citados tem opinião unânime em relação a sintomas como a linfadenopatia, a esplenomegália, as lesões cutâneas seborreicas, nodulares, ulcerativas e de hiperqueratose, a claudicação, a caquécia, a onicogribose, a letargia, a epistaxis, a palidez das mucosas e as lesões oculares como a conjuntivite e a uveíte (Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005; Baneth, 2009e; Pinhão, 2009).

É também partilhada por grande parte dos autores referidos na bibliografia a opinião de que virtualmente qualquer animal infectado com LCan tem algum grau de glomerulonefrite. Os sinais clínicos associados à glomerulonefrite são a poliúria/polidipsia, proteinúria, e incapacidade de concentração da urina quando a glomerulonefrite já causou algum grau de insuficiência renal crónica (IRC), sendo o compromisso renal a complicação mais

frequentemente associada à LCan (Costa *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007; Baneth *et al.*, 2008).

As alterações laboratoriais mais frequentemente descritas em cães infectados e sintomáticos são a elevação dos valores de Ureia (BUN), Creatinina, imunoglobulinas séricas e das enzimas hepáticas alanina amino-transferase (ALT) e fosfatase alcalina sérica (FAS) e o decréscimo dos valores de hematócrito, hemoglobina, albuminas e plaquetas (Amusategui, Sainz, Rodríguez, & Tesouro, 2003; Reis *et al.*, 2006; Terrazzano *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008; Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009).

O diagnóstico laboratorial é realizado através da observação do parasita nos tecidos afectados ou pela detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *L. infantum* (Miró, Cardoso, Pennisi, Oliva, & Baneth, 2008), as técnicas serológicas são utilizadas rotineiramente para confirmar a infecção em animais sintomáticos e são úteis em estudos de sero-prevalência (Oliva *et al.*, 2006; Miró *et al.*, 2007).

No presente não existe um composto que proporcione um tratamento 100% eficaz e que permita atingir a cura parasitológica em animais infectados. As drogas de primeira linha utilizadas no tratamento da LCan, os antimoniais pentavalentes, o alopurinol e a anfotericina B permitem na maioria dos casos a cura sintomática sem porém conseguirem evitar ocorrência de recidivas (Noli & Auxilia, 2005; Miró *et al.*, 2008).

A prevenção da infecção é efectuada através da aplicação de insecticidas e repelentes em unção punctiforme com imidaclopride e permetrina ou em colares impregnados de deltametrina e de uma série de medidas que diminuem a probabilidade de uma cão ser picado pelo insecto vector e assim ser infectado (Reithinger *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2007). Actualmente, na Europa, não é oficialmente recomendado qualquer tipo de vacina anti-leishmaniose, embora estejam em estudo alguns produtos que experimentalmente já provaram ser eficazes no bloqueio da infecção (Lemesre *et al.*, 2007).

II – Revisão Bibliográfica

1. Caracterização dos agentes etiológicos da LCan

1.1. Taxonomia

De acordo com Ross (1903), os protozoários do género *Leishmania* pertencem ao:

Reino Protista,

Sub-reino Protozoa,

Filo Sarcomastigophora,

Sub-filo Mastigophora,

Classe Zoomastigophora

Ordem Kinetoplastida,

Família Trypanosomatidae,

Género *Leishmania*

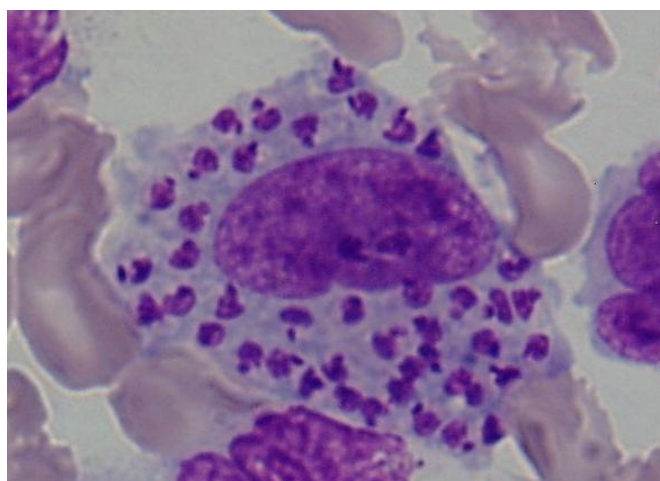
Dentro do género *Leishmania* existem espécies com ciclo de transmissão antroponótico, para as quais o hospedeiro vertebrado preferencial é o homem, como o complexo de espécies *L. donovani* na Índia (= *L. archibaldi* em África). O complexo de espécies *L. tropica* é responsável pela infecção na região mediterrânica oriental, Índia e África. Existem espécies de ciclo de transmissão zoonótico como o complexo de espécies *L. infantum*, no Velho Mundo (= *L. chagasi* no Novo Mundo), o agente etiológico da LCan em Portugal, que causa infecção preferencialmente em canídeos (Cortes, Afonso, Pires, & Campino, 2007), tanto domésticos como silvestres mas também em felinos e outros mamíferos (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003; Dipineto *et al.*, 2007; Sobrino *et al.*, 2008). Existe ainda o complexo de espécies *L. major* no Velho Mundo e *L. mexicana* e *L. braziliensis* no Novo Mundo que infectam preferencialmente roedores e marsupiais (Ready, 2008).

A caracterização das várias espécies do género *Leishmania* é efectuada com base em estudos de migração enzimática com os quais se identificaram 38 zimodemes do complexo de espécies *L. infantum*. Em Portugal, o zimodeme mais frequentemente implicado na infecção canina e humana é o MON-1 (Campino *et al.*, 2005; Campino, *et al.*, 2006) e o zimodeme MON-98 foi já também identificado como responsável pela infecção canina no território nacional (Cardoso *et al.*, 2002). Além de MON-1 também foram identificados, os zimodemes MON-24, MON-29 e MON-80 em casos da infecção em humanos (Campino *et al.*, 2006).

1.2. Ciclo biológico e formas evolutivas

As leishmanias são parasitas que apresentam duas formas evolutivas. A forma amastigota (Figura 6) é desprovida de motilidade e encontra-se nas células do SMF – monócitos, macrófagos, células de Langerhans da pele, células de Kupffer do fígado e células apresentadoras de antígenos – do hospedeiro vertebrado. Para a observação microscópica de formas promastigotas é necessário efectuar coloração. Utilizam-se derivados do método de Romanowsky (Giemsa, Wright ou Leishman) em que a hematoxilina-eosina cora substâncias acidófilas, o azul de metileno cora substâncias basófilas e os azules coram grânulos específicos. A forma promastigota tem forma ovóide, medindo 2,5-5 μm de comprimento e 1,5-2 μm de largura. O citoplasma cora de azul claro, o núcleo tem forma oval, localização excêntrica e cora de roxo claro e o cinetoplasto tem forma bastoniforme que cora de roxo escuro (Ciaramella & Corona, 2003a). O cinetoplasto é a estrutura que juntamente com o blefaroplasto originará o flagelo que proporciona a motilidade, característica da forma promastigota. A forma promastigota é extra-celular, encontra-se no intestino do flebótomo vector e resulta da transformação evolutiva da forma amastigota com que o vector se infecta quando se alimenta num cão infectado. Após a transformação evolutiva no intestino do vector, as leishmanias reproduzem-se e migram até à válvula estomodeal na faringe, onde causam uma obstrução que impede o fecho desta permitindo a passagem das leishmanias para o hospedeiro vertebrado, no momento em que o flebótomo faz uma nova refeição sanguínea.

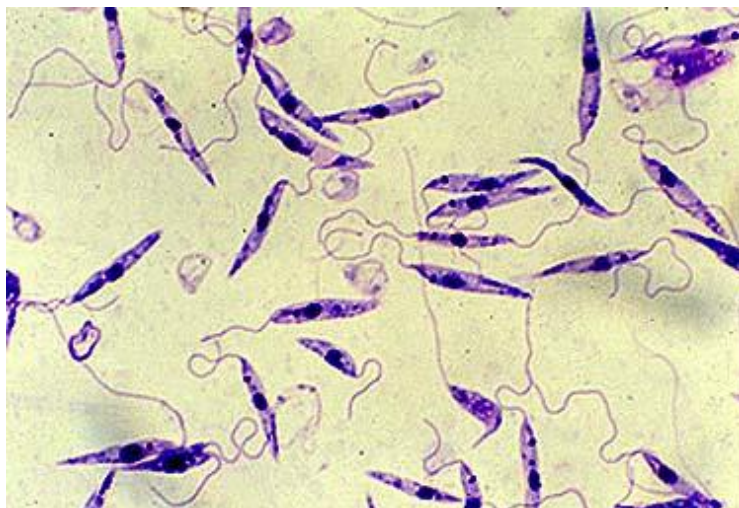
Figura 6 – Macrófago densamente parasitado por amastigotas de *Leishmania* sp. Coloração pelo método de Giemsa, ampliação 1000x.



A forma promastigota (Figura 7) tem 10-30 μm de comprimento e 1,5-3 μm de largura, apresenta flagelo anterior bem desenvolvido e cinetoplasto localizado entre o núcleo e o flagelo. Após inoculadas pelo vector, as formas promastigotas infectantes conseguem evitar o complemento, aderir aos macrófagos e entrar nestes. Uma vez no interior da célula, o promastigota tem a capacidade de resistir a enzimas hidrolíticas e oxidativas, de inibir a activação macrofágica e transformar-se na forma amastigota dentro do vacúolo parasitóforo onde perde o flagelo (Spath, Garraway, Turco, & Beverley, 2003).

No vacúolo parasitóforo, as formas amastigotas reproduzem-se por fissão binária até esgotarem as capacidades celulares e provocarem a lise da célula macrofágica. Os amastigotas livres (em circulação, ou nos tecidos), são fagocitados por outras células do SMF onde se vão continuar a reproduzir (Roze, 2005).

Figura 7 – Promastigotas de *Leishmania* sp.



Fonte: www.tuebingen.de/modeling/Mod_Leish_Intro_en.html

2. Caracterização dos vectores de *Leishmania* spp

Os flebótomos (Figura 8) classificam-se taxonomicamente, de acordo com Loew (1845), no:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Insecta,

Subclasse Pterygota,

Ordem Diptera,

Sub-ordem Nematocera,

Família Psychodidae,

Sub-família Phlebotominae

Género *Phlebotomus* (no Velho Mundo)

Género *Lutzomyia* (no Novo Mundo)

Figura 8 – *Phlebotomus papatasi*.



Fonte: www.onleish.org/index.php?article=24&visual=3

Os flebótomos são pequenos insectos alados, de cor castanha amarelada que medem cerca de 3 mm de comprimento, têm actividade crepuscular e nocturna, sendo modesta a sua capacidade de deslocação, cerca de 1 a 2 km quando as correntes de ar lhes são favoráveis. Os ecotipos ocupados pelos flebótomos (Figura 9) são áreas que têm algum tipo de vegetação que lhes serve de alimento e abrigo. Apenas as fêmeas são hematófagas por necessitarem da refeição sanguínea para a maturação dos ovos. Assim, alimentando-se com sangue de cães infectados com *Leishmania*, a fêmea de flebótomo ingere amastigotas

existentes nas células do SMF. Após a transformação em forma promastigota e da sua multiplicação no intestino médio, os promastigotas migram para a válvula estemodal e o vector torna-se infectante para os hospedeiros vertebrados. (Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005).

Figura 9 – Locais com condições propícias ao desenvolvimento de *Phlebotomus* sp. em várias localidades da Zona do Pinhal



O desenvolvimento dos flebótomos desde o ovo até L5 necessita de obscuridade e altos níveis de humidade. No seu habitat natural, os esconderijos dos flebótomos são muito difíceis de identificar. Caracterizam-se por possuírem material vegetal em decomposição, que oferece abrigo e alimento às larvas e onde a humidade é alta e as amplitudes térmicas não têm grandes variações. Localizam-se junto a colecções de águas paradas como charcos, lagoas, lagos decorativos, piscinas, caixotes de lixo, pneus, lixeiras e cursos de água com baixo caudal e corrente fraca (Roze, 2005).

Os flebótomos são inactivos a temperaturas inferiores a 15°C, a época de voo em Portugal, dependendo das condições geográficas e edafo-climáticas características do território, é entre Abril/Maio a Setembro/Outubro. É nesta altura do ano que o hospedeiro vertebrado se encontra em maior risco de ser picado e consequentemente infectado (Afonso *et al.*, 2005).

No nosso País, *Phlebotomus ariasi* e *P. perniciosus* são os vectores comprovados da LCan por terem sido capturadas e identificadas com a forma promastigota infectante de *L. infantum* e por terem capacidade de transmitir o agente etiológico, ao hospedeiro vertebrado durante a ingestão de sangue (Afonso *et al.*, 2005).

Também as espécies *P. papatasi*, *P. sergenti* e *Sergentomyia minuta* são frequentemente capturados juntamente com os dois vectores em estudos epidemiológicos, mas além dos primeiros, nenhuma das outras espécies é oficialmente considerada vector da LCan em Portugal (Maia, Afonso, Neto, Dionísio, & Campino, 2009).

P. ariasi e *P. perniciosus* têm diferentes distribuições e prevalência, a variação do número de espécies capturado é influenciada pelas condições climáticas, *P. ariasi* parece ser mais abundante em alturas de menos calor e maior humidade que *P. perniciosus*. Na região de Évora foi *P. sergenti* o flebotomíneo capturado mais prevalente na amostra dum estudo epidemiológico de LCan (Semião-Santos *et al.*, 1995), enquanto na Serra da Arrábida, foram *P. perniciosus* e *S. minuta*, por ordem decrescente, as espécies mais vezes identificadas (Afonso *et al.*, 2005).

Experimentalmente, demonstrou-se a capacidade infectante que cães infectados por *L. chagasi* têm para os parasitas hematófagos pulga (*Ctenocephalides felis felis*) e carraça (*Rhipicephalus sanguineus*) e demonstrou-se também a capacidade de infecção de homogeneizados destes ectoparasitas para hamsters (*Citellus citellus*), quando inoculados via oral e intraperitoneal (Coutinho *et al.*, 2004; Coutinho & Linardi, 2007).

Baseado no pressuposto de que os cães podem ingerir ectoparasitas infectados, durante os seus hábitos de higiene e sociabilização, foram realizados no Brasil dois estudos numa tentativa de apoiar a hipótese do envolvimento destes ectoparasitas na transmissão de *L. chagasi* (= *L. infantum*) em zonas de elevada sero-prevalência de LCan onde a taxa de infecção por *Lutzomyia longipalpis*, vector autóctone da LCan, é baixa. (Coutinho *et al.*, 2004; Coutinho & Linardi, 2007).

Ambos os ectoparasitas são hematófagos e infectam-se naturalmente com *L. chagasi* ao ingerirem sangue de cães infectados com o protozoário. No entanto, não foi provada até hoje, a capacidade de transmissão de *L. chagasi* a um hospedeiro vertebrado susceptível, por pulgas ou carraças infectadas através da toma de uma refeição sanguínea. Adicionalmente, quando ingeridas por pulgas ou carraças, as formas amastigotas não evoluem a promastigotas (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) nem se conseguem multiplicar nestes ectoparasitas. Embora haja evidência da capacidade infectante dos homogenizados destes ectoparasitas quando infectados, para um hospedeiro vertebrado susceptível em condições experimentais, faltam estudos que comprovem competência destes ectoparasitas como vectores da LCan e o seu verdadeiro papel na epidemiologia da doença (Otranto & Dantas-Torres, 2008).

3. Epidemiologia

A LCan é endémica em regiões tropicais e subtropicais, como na Índia, certas regiões de África, no Médio Oriente, na Bacia Mediterrânica e América do Sul. Nestas regiões do planeta, o vector encontra ecotipos favoráveis à sua propagação e nelas co-habitam populações de hospedeiros infectados.

Figura 10 – Região endémica da Bacia Mediterrânica



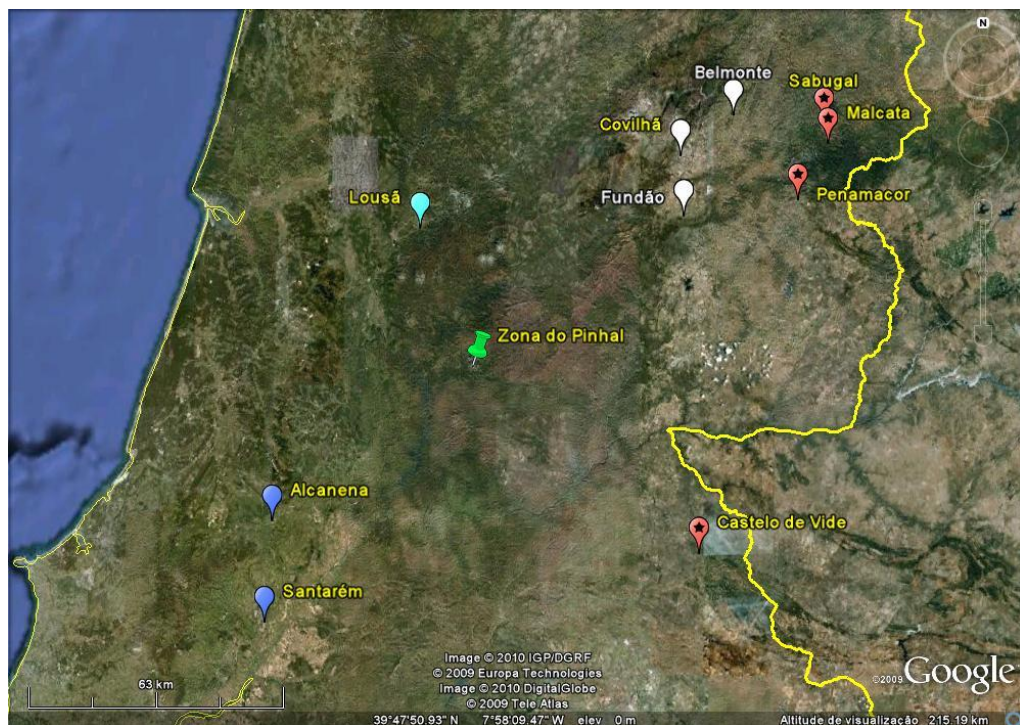
Seroprevalência da LCan entre 8,5 - 20,5% na área a vermelho (Dujardin, *et al.*, 2008).

O cão (*Canis familiaris*) é o hospedeiro reservatório da doença em relação à espécie humana (*Homo sapiens*) e é também a espécie animal onde é actualmente relatado o maior número de infecções naturais com *L. infantum*. A infecção na espécie felina (*Felis catus*) não tem tido a atenção dada à LCan, embora o primeiro caso de leishmaniose felina oficialmente relatado em Portugal remonte ao ano de 1994 (Costa-Durão, Rebelo, Peleteiro, Correia & Simões, 1994). Existem também em número bastante inferior, estudos de prevalência da infecção, em canídeos silvestres como no lobo (*Canis lupus*) e na raposa (*Vulpes vulpes*) e também no Lince Ibérico (*Lynx pardina*) (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003; Dipineto *et al.*, 2007; Sastre *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2008).

Nas regiões endémicas, o vector completa o seu ciclo biológico e as refeições sanguíneas são vitais para a maturação dos seus ovos. As fêmeas infectadas e com capacidade infectante, propagam a infecção ao se alimentarem em hospedeiros sãos, aumentando assim o número de hospedeiros vertebrados infectados e com ele a probabilidade de mais se poderem infectar.

Os vários rastreios da infecção em canídeos que têm vindo a ser efectuados desde o início da década de oitenta, revelam resultados de seroprevalência crescente à medida que nos aproximamos do presente. Estes dados são o reflexo dum interesse crescente pela doença e dos avanços tecnológicos na área do diagnóstico que permitem uma detecção cada vez mais eficaz da infecção. Os rastreios efectuados permitem vislumbrar cada vez melhor o cenário da LCan em Portugal e proporcionam um conhecimento cada vez mais completo da epidemiologia da doença, já não são apenas referidas na bibliografia da LCan apenas as três regiões de alta prevalência da doença (Alto-Douro, Lisboa e Algarve), cada vez mais se obtém informação de diferentes zonas do território nacional (Figura 11) (Semião-Santos *et al.*, 1995; Afonso *et al.*, 2005).

Figura 11 – Mapa da prevalência da LCan na região centro de Portugal e localização da Zona do Pinhal.



Marcadores azuis-escuro - 10,3%; marcador azul-claro - 6,2%; marcadores brancos - 12,5% (Campino, Cardoso, Villa de Brito, Carvalho, & Neves, 2008); marcadores encarnados-estrela - 34% (locais de captura de animais de um estudo de prevalência de LCan em raposas na Beira Interior e Alentejo: Pereira da Fonseca *et al.*, 2003); marcador verde – Zona do Pinhal.

As alterações climáticas alteram a distribuição do vector, na medida em que permitem que o flebótomo se estabeleça em regiões onde no passado não se encontrava devido às temperaturas mais baixas que aí se faziam sentir (Ready, 2008).

O conhecimento do verdadeiro impacto que as alterações climáticas têm na distribuição do vector na bacia Mediterrânica e em Portugal que se possam reflectir numa alteração significativa da epidemiologia da LCan, podem ser um instrumento útil para um aprofundamento ainda maior do conhecimento sobre esta doença, de como as populações, tanto de canídeos como de humanos lidaram no passado com a infecção e como poderão vir a lidar no futuro.

O papel das populações de canídeos e outros carnívoros silvestres na epidemiologia da LCan está ainda por esclarecer. Há falta de dados sobre a capacidade infectante dos hospedeiros do ciclo silvático como a raposa ou o lobo, para o vector. Além disto existem diferenças nos padrões de *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) efectuados ao DNA de *L. infantum* presente em cães infectados e em canídeos silvestres, que não permitem concluir se o ciclo de transmissão de leishmaniose silvestre influencia o ciclo de transmissão doméstico (Sobrinho *et al.*, 2008).

Vários estudos foram efectuados em populações de canídeos silvestres tanto no seu habitat natural como em cativeiro, em Espanha, Itália e Portugal. Os estudos revelaram que a prevalência da infecção em raposas na Europa oscila entre 14,1 - 40% e em lobos entre 9 - 20,5% (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003; Dipineto *et al.*, 2007; Sastre *et al.*, 2008; Sobrinho *et al.*, 2008).

Sabendo-se que a prevalência da infecção em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes silacea*) na região endémica de Lisboa era de 5,6% (4/71), foi realizado um estudo para determinar essa mesma prevalência em raposas apanhadas durante a época de caça 2001-2002 na região da Beira Interior e do Alentejo. O estudo revelou uma prevalência da infecção de 34% (17/50), 37,5% (12/32) na Beira Interior e 27,7% (5/18) no Alentejo, determinada através da observação microscópica do parasita em esfregaços de órgãos infectados (Pereira da Fonseca, *et al.*, 2003).

Os casos de LCan diagnosticados em regiões livres da doença são o um reflexo da globalização e mobilidade mundial. Animais que permaneceram ou têm proveniência de áreas endémicas, ou que receberam qualquer tipo de transfusão com sangue de animais infectados constituem a casuística da LCan em zonas livres do vector (Ready, 2008). Um estudo efectuado na Holanda, através dum inquérito realizado aos donos, revelou que anualmente 58.000 cães daquele país são levados de férias com os donos a países do sul da Europa, onde a LCan é endémica. O posterior rastreio serológico realizado aos cães, e um outro rastreio efectuado a cães suspeitos de estarem infectados com LCan que haviam viajado ao sul da Europa, excluindo os que de lá tinham proveniência permitiu calcular que a

probabilidade de uma cão que habita numa região livre da doença se infectar por viajar até um região endémica é de 0,027-0,23% (Teske, Knapen, Beijer, & Slappendel, 2002).

A transmissão venérea é outra via pela qual se pensa que a LCan pode ser transmitida horizontalmente sem a participação de um vector (Ciaramella & Corona, 2003a; Diniz, *et al.*, 2005; Miró, 2005; Roze, 2005; Baneth *et al.*, 2008). Um estudo brasileiro demonstrou que a inflamação dos órgãos genitais em cães infectados se deve à presença de amastigotas. Os cães infectados revelaram ainda a presença de DNA das leishmanias no sémen (Diniz *et al.*, 2005), adicionalmente existe um caso de transmissão venérea bem documentado de LV (Baneth *et al.*, 2008).

A transmissão vertical transplacentária foi documentada na descendência de um casal da raça Beagle experimentalmente infectado, embora estudos efectuados em condições naturais tenham chegado a resultados opostos. A possibilidade de transmissão através de agressões que provoquem feridas abertas proporcionando o contacto sanguíneo directo entre animais, é uma possível via de transmissão para a qual também é necessária mais investigação no intuito de se esclarecer se esta é ou não uma via de transmissão viável (Baneth *et al.*, 2008).

4. Patogenia

Vários estudos têm sido efectuados no intuito de tentar esclarecer o curso da infecção por leishmanias com base no tipo de resposta imunitária demonstrada pelo hospedeiro contra o agente etiológico (Vouldoukis *et al.*, 1996; Gallego *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2006; Day, 2007; Miranda, Roura, Picado, Ferrer, & Ramis, 2008). O sistema imunitário pode desenvolver dois tipos de resposta, um com predomínio de linfócitos B, de carácter fortemente humoral que determina uma evolução da infecção com rápida deterioração do estado geral do animal. No extremo oposto existe uma resposta imunitária com predomínio de linfócitos T, com componente fortemente celular que se traduz numa evolução benigna da infecção sem manifestações clínicas (Gallego *et al.*, 2000; Ciaramella & Corona, 2003a).

O tipo de resposta demonstrada pelos canídeos não apresenta um padrão dicotómico como a demonstrada pelos modelos murinos, verifica-se antes a prevalência de um ou de outro tipo de resposta, sendo essa prevalência que dita a evolução da infecção (Baneth *et al.*, 2008). A imunidade protectora contra as leishmanias é mediada por respostas celulares do tipo CD4+ T helper 1 (Th1). Quando activados os linfócitos segregam citocinas como Interferão-gama (INF- γ), Interleucina-12 (IL-12), IL-2 e Factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que induzem nos macrófagos actividade anti-leishmania (Vouldoukis *et al.*, 1996; Baneth *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, 2009).

A morte das leishmanias está ligada à indução da via da óxido nítrico sintetase (NOS), porque se correlacionou com a produção de compostos derivados do azoto e porque foi anulada na presença dum inibidor competitivo da via da NOS. Após efectuado um tratamento com sucesso, os macrófagos podem adquirir actividade anti-leishmania na presença de linfócitos autólogos através dum mecanismo dependente do INF- γ (Vouldoukis *et al.*, 1996; Baneth *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, 2009). Verificou-se um aumento da produção de derivados nitrogenados em animais que efectuaram tratamento e atingiram a cura clínica, por outro lado a produção de derivados nitrogenados foi anulada na presença dum inibidor competitivo da NOS. Os níveis de citrulina sérica que foram produzidos após a activação da via da NOS atingiram níveis bastantes altos em cães nos quais a terapêutica teve sucesso na cura sintomática. Estes dados permitiram concluir que em casos de LCan, após uma terapêutica com sucesso, as leishmanias são destruídas pelos macrófagos activados por linfócitos produtores de INF- γ através dum mecanismo dependente do óxido nítrico (NO) (Vouldoukis *et al.*, 1996).

A imunidade humoral é mediada por respostas celulares do tipo T helper 2 (Th2), com produção de citoquinas como IL-4, IL10 e TNF- β , produção de linfócitos B e activação de plasmócitos com produção de altos níveis de imunoglobulinas não protectoras (Baneth *et al.*, 2008).

A susceptibilidade para que um cão infectado desenvolva LCan activa, com sinais clínicos, que será discutida no capítulo seguinte, é regulada por factores genéticos e pelo estado do sistema imunitário do cão. O período de incubação é longo e o aparecimento de sinais clínicos após a infecção pode tardar entre três meses a sete anos. Parte dos cães infectados nunca manifesta a doença, são resistentes, outra parte só desenvolve a doença numa idade mais avançada quando as imunossupressões são mais frequentes, outra parte compreende aqueles cães que após serem infectados, passam um tempo variável como infectados assintomáticos e mais tarde vêm a desenvolver sinais clínicos. (Ciaramella & Corona, 2003a).

Uma resposta Th2, do tipo humoral que se caracteriza pela produção de grandes quantidades de imunoglobulinas não protectoras, que ao se ligarem aos antígenos das leishmanias formam imunocomplexos nefastos e por uma incapacidade celular de impedir a disseminação e multiplicação de amastigotas pelo organismo, é o mecanismo fisiopatológico chave na LCan. A apoptose dos macrófagos parasitados é consequência da multiplicação dos amastigotas o que origina ainda maior disseminação das leishmanias para os tecidos envolventes e circulação. Quando estão no meio extra-celular, as leishmanias invadem outras células provocando uma resposta inflamatória granulomatosa nos tecidos onde se alojam. A infecção é assim perpetuada provocando a formação de mais imunocomplexos e produção de anticorpos anti-nucleares (ANA's) (Baneth *et al.*, 2008).

A deposição dos imunocomplexos circulantes está associada a lesões de glomerulonefrite que pode ser sintomática ou não mas que atinge virtualmente todo o animal que esteja infectado (Costa *et al.*, 2003). Nos vasos, os imunocomplexos provocam lesões de vasculite que levam à activação da cascata do complemento, um importante mecanismo fisiopatológico que provoca a necrose tecidual patente nas lesões dérmicas, viscerais e oculares (Blavier *et al.*, 2001; Ciaramella & Corona, 2003a; Miró, 2005; Roze, 2005).

As alterações cutâneas revelam que há uma diminuição do número de fibras de colagénio tipo I em relação às do tipo III na matriz extra-celular da pele que se relaciona proporcionalmente com a severidade das lesões. Contudo estas lesões não são necessariamente provocadas por uma reacção inflamatória à presença do parasita na pele e num estudo, as biopsias efectuadas em pele saudável de cães infectados revelaram cargas parasitárias similares àsquelas encontradas em biopsias de pele lesionada (Baneth *et al.*, 2008).

As lesões repetidas de dermatite originam hiperqueratose, essencialmente do focinho, almofadinhas plantares e zonas de decúbito (Pinhão, 2009).

As alterações histopatológicas do cancro de inoculação, um nódulo que se desenvolve frequentemente entre um a seis meses em resposta à picada do flebótomo que desaparece espontaneamente, revela um infiltrado histiocitário e grande quantidade de parasitas, (Roze, 2005).

A sintomatologia visceral é diversa, a linfadenomegália é o sintoma mais frequente em cães infectados sintomáticos. O aumento do número e tamanho dos folículos linfóides e a marcada hipertrofia e hiperplasia dos macrófagos medulares são os mecanismos fisiopatológicos que provocam o aumento do tamanho dos linfonodos. Não obstante, a carga parasitária nos linfonodos aumentados não se correlaciona proporcionalmente com a severidade do quadro clínico (Baneth *et al.*, 2008). A esplenomegália é causada pelo aumento dos monócitos e macrófagos e alterações na microvasculatura deste órgão com a génese de abundantes veias e vénulas pulpare (Baneth *et al.*, 2008).

As lesões articulares características da LCan são resultado de uma reacção de hipersensibilidade tipo III devido à deposição de imunocomplexos com a presença de amastigotas no líquido sinovial ou no interior de macrófagos na membrana sinovial (Santos, Marcos, Assunção, & Matos, 2006). As alterações ósseas são provocadas por lesões intramedulares e periósticas do tipo osteolítico, osteoproliferativo, esclerótico, osteomielíticas e granulomatosas com a presença de amastigotas dentro dos macrófagos (Souza *et al.*, 2005; Giménez & Menéndez, 2005).

A polimiosite crónica provocada pela presença de infiltrados de células do SMF parasitadas com amastigotas em conjunto com a vasculite neutrofílica e os imunocomplexos no tecido muscular adicionados aos anticorpos anti-miofibrilares do soro e o estado catabólico em

que se encontram os cães com LCan sintomática provocam a caquécia que por vezes se observa nestes animais (Baneth *et al.*, 2008).

A deposição de imunocomplexos a nível da íris causa uveítes. Uma uveíte anterior complicada pode causar sinéquias posteriores (aderências entre a íris e o cristalino) que impedem a passagem de humor aquoso da câmara posterior para a anterior, levando ao aumento da pressão intra-ocular com consequente formação de hipópion ou hifema. Também se podem desenvolver sinéquias anteriores marginais como consequência duma uveíte hipertensiva, nesse caso formam-se aderências entre a íris e a córnea. A obstrução à drenagem do humor aquoso ao nível do ângulo irido-corneal causa o aumento da pressão intra-ocular podendo vir a desenvolver-se glaucoma (Sauquillo, 2005).

Em muitos casos de LCan os animais desenvolvem anemia – Hematócrito < 37% e hemoglobina < 12 g/L. Esta tem várias causas, pode dever-se a destruição excessiva de hemácias por processos imunomediados, a lesões de vasculite, a eritropoiese reduzida devido à cronicidade da LCan, à síntese diminuída de eritropoietina derivada da IRC ou ainda devido a repetidos episódios hemorrágicos. Os fenómenos hemorrágicos estão associados a lesões inflamatórias ou ulcerativas da mucosa mas também a distúrbios da coagulação e lesões de vasculite (Terrazzano *et al.*, 2006; Moraitou *et al.*, 2007).

Num estudo, foram detectadas por biópsia em 26% dos pacientes com LCan, lesões de colite assintomática. O padrão inflamatório da mucosa foi na maioria das lesões um infiltrado piogranulomatoso (90%), com presença de amastigotas de leishmania, muito semelhante ao observado na pele (Moraitou *et al.*, 2007), este tipo de lesões tem um importante papel no mecanismo fisiopatológico que origina diarreia em alguns casos de LCan.

Se a evolução da LCan não for travada, a glomerulonefrite agrava-se, nos glomérulos afectados, as alterações patológicas na barreira de filtração glomerular levam à perda de proteínas na urina. Nos glomérulos sãos verifica-se uma hiperfiltração compensadora que agrava ainda mais a proteinúria. A albumina, pelo seu peso molecular inferior em relação às globulinas, é a proteína sérica que se perde mais facilmente, vindo os níveis baixos desta proteína a diminuir a pressão oncótica do plasma. Se as perdas de albumina pelo rim lesionado não forem compensadas por uma maior produção a nível do fígado haverá formação de edemas e ascite (Ciaramella & Corona, 2003a). A perda de proteínas da coagulação conduz a distúrbios neste processo fisiológico, podendo mesmo desenvolver-se um estado hipercoagulável com coagulação intravascular disseminada (CID), como acontece em episódios de síndrome nefrótica (Félix *et al.*, 2008), com a possibilidade de formação de trombos ou alterações na hemostase. Os episódios hemorrágicos, quando se desenvolvem tornam-se frequentes e pode observar-se em muitos casos a inquietação do animal, sendo este um dos principais argumentos apresentados pelos proprietários para o pedido de eutanásia do seu cão (Baneth *et al.*, 2008). A incapacidade de travar a infecção e

a lesão cumulativa do tecido renal resulta invariavelmente em IRC. Sintomas como os anteriormente referidos (polidipsia/poliúria, anorexia, vômito, diarreia, edemas) e outros como úlceras do aparelho digestivo ou proteinúria, põem-se de manifesto quando a IRC se encontra numa fase bastante avançada em que o controlo do estado geral do paciente é já de difícil alcance (Font, 2000).

O desenvolvimento de sintomatologia em pacientes infectados com LCan está fortemente associado à forte resposta do tipo Th2 em detrimento do tipo Th1. Tal facto observar-se na diferença dos perfis dos proteinogramas de cães infectados sintomáticos e dos de cães infectados assintomáticos, os pacientes sintomáticos revelam hiperglobulinémia, enquanto os animais assintomáticos apresentam valores de imunoglobulinas mais baixos (Reis *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2008).

Certos autores defendem que as subclasses de imunoglobulina G (IgG) envolvidas no tipo de resposta imunitária caracterizam essa mesma resposta, assim, numa resposta do tipo Th1 encontrar-se-iam predominantemente IgG2 e numa do tipo Th2 seriam maioritariamente encontradas IgG1 (Iniesta, Gallego, & Portús 2005). Tal paradigma foi posto em foco por resultados ambíguos apresentados. Foi recentemente demonstrado que tais disparidades se devem à falta de especificidade dos reagentes usados (Quinnel *et al.*, 2003). Vários estudos efectuados em cães naturalmente e experimentalmente infectados, usando anticorpos monoclonais para IgG1 e IgG2 caninos, revelaram um aumento imediato de ambas as subclasses de imunoglobulinas, evidenciando a falta de sentido prático da classificação da subclasse de IgG maioritariamente produzida num ou noutro tipo de resposta (Day, 2007).

Um estudo longitudinal foi realizado em Itália num conjunto de 43 cães da raça Beagle expostos a três ciclos de transmissão (2002-2004). Durante 32 meses estes animais foram examinados periodicamente, foi registada a evolução da sintomatologia, resultados de microscopia e PCR da medula óssea, cultura de linfonodos e serologia. Com início em Janeiro, a maior taxa de positivos foi obtida com PCR (23,3-97,3%), a sensibilidade dos métodos parasitológicos e serológicos foi mais baixa mas aumentou ao longo do tempo (de 15,8 a 77,8%). Dos cães detectados como positivos no PCR mas como negativos a outros testes (infecção sub-patente), uns permaneceram sob tal condição até ao fim do estudo, outros converteram-se em negativos no PCR em exames posteriores. Todos os cães que foram detectados como positivos nos testes serológicos e/ou de microscopia e de cultura (infecção patente assintomática), evoluíram para LCan sintomática, 68% dos quais desenvolveram LCan sintomática (infecção patente sintomática) sete meses após serem detectados como positivos para todos os testes. A infecção pós-exposição foi mais alta e bastante diferente entre as exposições de 2002 e 2003, 39,5% e 91,7% respectivamente. Estes resultados foram observados muito provavelmente devido à grande densidade de canídeos infectados que partilhavam o local onde foi realizado o estudo e desta densidade

ter aumentado ao longo do tempo. O tempo de evolução da infecção foi altamente variável para cada cão individualmente mas puderam estabelecer-se 3 padrões de evolução. Rápido estabelecimento da condição patente (0-2 meses até se detectar a infecção), condição sub-patente prolongada (4-22 meses) antes da evolução e condição sub-patente transitória seguida de 10 a 21 meses de aparente “status” livre de LCan antes da evolução (Oliva *et al.*, 2006).

5. Susceptibilidade

Na tentativa de elucidar que factores genéticos poderiam influenciar a direcção em que a resposta imunológica é direccionada, foram efectuados vários estudos. Actualmente é do conhecimento da comunidade científica que existem dois genes caninos intimamente ligados à susceptibilidade para desenvolver sinais clínicos.

A testagem de genes candidatos revelou ligação ao polimorfismo do gene “Natural resistance associated macrophage protein 1” (NRAMP1), mais tarde denominado gene Slc11a1. Este gene, codifica um anti-transportador bivalente catião-protão que desempenha um papel vital na regulação da actividade dos macrófagos, incluindo supra-regulação de genes, de quimiocinas, de citocinas como o TNF- α e IL-1b e indução da enzima NOS. Foi demonstrado que o polimorfismo associado à mutação de um único nucleótido da região promotora de Slc11a1 está ligado à susceptibilidade para o desenvolvimento de sintomatologia num cão infectado e que certos haplotipos de Slc11a1 estão também ligados a essa susceptibilidade. A raça Boxer está representada acima da média na bibliografia sobre LCan, a determinante genética para tal, é o facto de muitos dos exemplares desta raça possuírem na região promotora de Slc11a1 o alelo TAG-8-141 que determina a susceptibilidade para LCan tanto em homo como em heterozigotia (Baneth *et al.*, 2008).

Numa população de cães errantes no Brasil, num estudo de variação genética no Complexo maior de histocompatibilidade-II (CMH-II), denominado o sistema do antigénio do leucócito canino (DLA), foi demonstrada uma associação significativa entre a presença do alelo DLA-DRB1*01502 e a susceptibilidade para LCan (Baneth *et al.*, 2008).

6. Sinais clínicos

Sendo uma afecção multi-sistémica, a LCan apresenta-se com uma panóplia de sinais clínicos muito diversificada, que a torna muitas vezes num verdadeiro desafio de diagnóstico para o Médico Veterinário. Inclusive, à medida que a doença progride, podem aparecer mais e diferentes sinais clínicos daqueles que constituíram o primeiro estímulo iatrotópico. Os cães infectados sintomáticos apresentam sintomatologia cutânea e/ou a visceral, no entanto as imagens histopatológicas de diferentes tecidos revelam invariavelmente uma reacção inflamatória granulomatosa com macrófagos parasitados por amastigotas (Baneth *et al.*, 2008).

A sintomatologia cutânea (56-89%) manifesta-se sob quatro padrões lesionais: dermatite alopécica exfoliativa, dermatite nodular, dermatite pustular e dermatite ulcerativa. A dermatite alopécica exfoliativa (Figura 12) (27-91%) que pode ser generalizada (Figura 15) ou localizada nas zonas de decúbito, região nasal (Figura 13), peri-ocular (*lunettes*) e bordos do pavilhão auricular caracteriza-se por uma seborreia seca de cor branca prateada (Pinhão, 2009; Blavier *et al.*, 2001).

Figura 12 – Alopecia da ponta da cauda.



Figura 13 – Alopecia no plano nasal.



A dermatite nodular (Figura 14) (2-17%) é por vezes acompanhada de descoloração (Blavier *et al.*, 2001). Nos bordos livres das pálpebras (Figura 22) surgem por vezes múltiplos granulomas de pequena dimensão, com grandes cargas parasitárias (Roze, 2005).

Figura 14 – Nódulo no plano nasal.

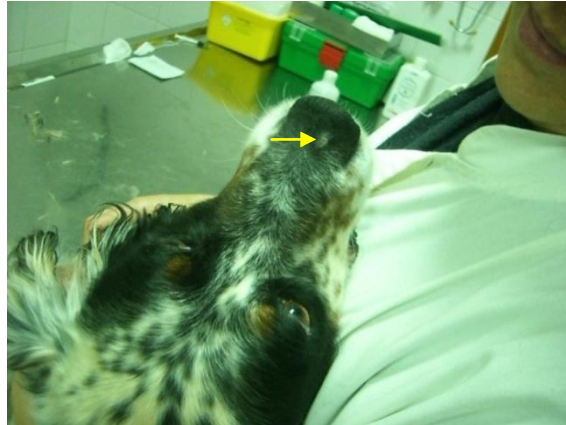


Figura 15 – Alopecia generalizada da cabeça com lesões de hiperqueratose e crostas no bordo do pavilhão auricular.



A dermatite pustular é o padrão lesional cutâneo mais raro (2-13%) (Blavier *et al.*, 2001) que acompanha as infecções sintomáticas.

Por fim, a dermatite ulcerativa (23-64%) caracteriza-se por crostas e úlceras indolentes com localização maioritariamente nos bordos do pavilhão auricular, zonas de decúbito e prepúcio (Figura 16) (Blavier *et al.*, 2001; Ciaramella & Corona, 2003a; Miró, 2005; Roze, 2005; Baneth, 2009e).

Num estudo no Brasil com o propósito de tentar investigar a possibilidade de transmissão venérea da LCan, descobriu-se que em cães do sexo masculino, naturalmente infectados com *L. donovani*, detectados serologicamente como positivos e sintomáticos, apresentavam lesões inflamatórias do tipo granulomatoso com infiltrados linfo-histiocitários dos órgãos do aparelho reprodutor. A presença de amastigotas no interior de macrófagos nos órgãos

genitais detectada por métodos imunohistoquímicos foi positivamente relacionada com o grau de inflamação apresentado pelos tecidos. A frequência de positividade de detecção de leishmanias nos diferentes tecidos analisados foi a seguinte: epidídimos (95%), prepúcio (95%), *bulbus glandis* (75%), testículos (75%) e próstata (53%). Neste estudo foi também detectada através de PCR, a presença de DNA de leishmania no sêmen dos cães (Diniz *et al.*, 2005).

Figura 16 – Úlcera prepucial.



Fonte: Miró (2005)

O cancro de inoculação (Figura 14) é uma reacção inflamatória local em resposta à inoculação das leishmanias na derme aquando da picada do vector que se observa geralmente no focinho e pavilhão auricular.

A onicogribose – unhas de faquir – é um crescimento exuberante com curvatura excessiva das unhas (Figura 17 e 18), um sintoma que se observa em 8 a 31% dos casos sintomáticos (Baneth *et al.*, 2008; Pinhão, 2009).

A hiperqueratose causada pelos sucessivos episódios de dermatite pode observar-se essencialmente no focinho (Figura 22), almofadinhas plantares (8%) e zonas de decúbito, mas também em qualquer outro ponto da pele lesionada (Figura 18) (Pinhão, 2009).

Figura 17 – Onicogrifose: crescimento e curvatura exagerada das unhas.



Figura 18 – Onicogrifose, hiperqueratose e alopecia.



A sintomatologia visceral é diversa, a linfadenomegália (36-90%) (Baneth *et al.*, 2008; Pinhão, 2009), é o sintoma mais frequente em cães infectados sintomáticos. Esta pode ser localizada ou generalizada, mas mais frequentemente detecta-se o aumento dos linfonodos poplíteos ou por vezes apenas de um dos dois. À palpação, além do tamanho aumentado o animal manifesta por vezes também dor (Baneth *et al.*, 2008). A esplenomegália é um sinal clínico difícil de detectar, especialmente se o aumento do baço for pouco exuberante e se não se dispuser de um método auxiliar de diagnóstico apropriado, manifesta-se em 10-53% dos casos (Baneth *et al.*, 2008).

Há a considerar também a claudicação, (4-43%) devida a alterações ósseas e articulares (Blavier *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2005), as últimas apresentam-se geralmente com aumento do tamanho e da temperatura da articulação afectada - artrite - e o animal manifesta dor à manipulação ou durante a locomoção. Neste tipo de alterações, podem detectar-se ao raio-X lesões de poliartrite erosiva e não erosiva (Figura 19).

Figura 19 – Radiografia do tarso esquerdo exibindo sinais de artrite não erosiva com leves sinais de doença degenerativa da articulação.



Fonte: Santos *et al.*, (2006)

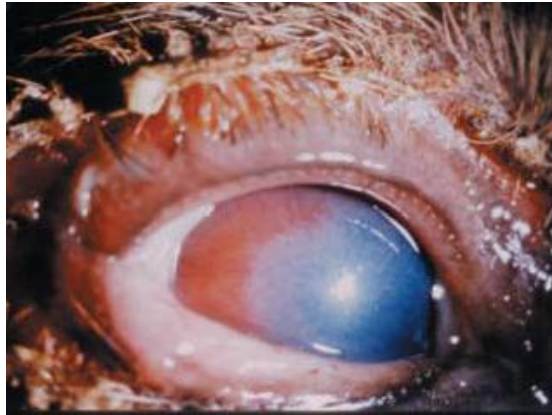
A caquécia (Figura 20) caracterizada pela atrofia muscular progressiva e é observável em 10-48% dos casos de LCan estudados por Baneth *et al.*, (2008).

Figura 20 – Caquécia.



As manifestações oculares estão presentes em 16-81% dos cães sintomáticos e as alterações mais frequentes são: conjuntivite (Figura 21) (1,6-40%), queratite (5-12%), uveíte (1-8%), blefarite (Figura 21) (16%) ou uma combinação das anteriores (26,3%) (Blavier *et al.*, 2001; Sauquillo, 2005; Brito *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008).

Figura 21 – Aspecto do olho de um cão afectado por LCan: blefarite, conjuntivite, vascularização e edema da córnea.



Fonte: Sauquillo, 2005.

Figura 22 – Granuloma palpebral e hiperqueratose nasal.



Em muitos casos de LCan pode observar-se a palidez das membranas mucosas, este sinal clínico é patente em 21-58% dos casos sintomáticos (Baneth *et al.*, 2008; Pinhão, 2009).

A anemia tem por vezes como causa vários episódios hemorrágicos como a epistáxis (Figura 23) (4-15%) (Blavier *et al.*, 2001), a diarreia hemorrágica ou a hematuria (Baneth *et al.*, 2008; Miró, 2005).

Figura 23 – Epistáxis



Fonte: Baneth *et al.*, 2008.

A glomerulonefrite devida à deposição de imunocomplexos que se desenvolve em virtualmente todos os cães com LCan (Costa, *et al.*, 2003), nem sempre se manifesta clinicamente, embora o rastreio de sintomas como poliúria (11%), polidipsia (4-40%), anorexia (17-33%), vômito ou diarreia (3-37%) deva fazer parte do questionário a fazer ao dono dum cão suspeito de padecer de LCan (Blavier *et al.*, 2001; Pinhão, 2009; Marques M. I., 2008).

Na LCan observa-se ainda perda de peso (23-60%) sem anorexia ou inapetência, letargia (20-60%), anorexia (17-33%) e por vezes pirexia (4-36%) quando a afecção segue uma evolução aguda ao contrário do curso crónico ou sub-agudo mais comum (Blavier *et al.*, 2001; Marques M. I., 2008; Pinhão 2009).

7. Diagnóstico laboratorial

7.1. Alterações bioquímicas e hematológicas

Na abordagem clínica dum paciente com LCan, devem ter-se em atenção certos parâmetros que podem ser de grande valor na percepção do estado geral. Como perfil inicial, deve ser realizado o hemograma completo, proteinograma, parâmetros bioquímicos hepáticos e renais e urianálise. Anemia normocítica, normocrômica, não regenerativa foi detectada em 45% dos casos sintomáticos estudados por um dos autores citados (Font, 2000).

Ainda mais significativo é o proteinograma, 100% dos casos estudados pelo mesmo autor (Font, 2000) revelaram hiperglobulinémia, factos que estão de acordo com os trabalhos de outros autores que consideram a hiperglobulinémia a alteração laboratorial mais frequente nos casos de LCan (Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009).

A trombocitopénia, por vezes presente, está associada à produção de imunoglobulinas, nomeadamente imunoglobulinas M (IgM) e IgG contra a membrana das plaquetas (Terrazzano *et al.*, 2006), mas estão também envolvidos mecanismos de trombocitopoiése deficiente ou de aumento do consumo de plaquetas como acontece nos estados hipercoaguláveis. A perda de proteínas da coagulação como a anti-trombina (AT), a tromboplastina e o fibrinogénio, através do rim ou a falta de produção destes por parte do fígado, adicionado às lesões de vasculite e ao fluxo de sangue diminuído, levam ao estado hipercoagulável que se observa no síndrome nefrótico e que pode em alguns casos dar lugar a CID com formação de trombos (Félix *et al.*, 2008).

A azotémia instala-se com a progressão da lesão renal e pode caracterizar-se através dos valores séricos aumentados de Creatinina e BUN. As concentrações séricas destes catabólitos proteicos e a avaliação da proteinúria são indicadores do grau de severidade da IRC e portanto, factores chave para a elaboração dum prognóstico. Um aumento de grande magnitude dos valores de ambos os catabólitos é indicador de mau prognóstico e significa a perda de grande quantidade de tecido renal funcional (Costa *et al.*, 2003). O aumento dos níveis plasmáticos do ião fosfato indica que a IRC se encontra já num estado terminal e que o prognóstico é muito desfavorável, podendo este aumento ser acompanhado de níveis de cálcio igualmente aumentados ou então diminuídos (Garcia *et al.*, 2007).

Para confirmar ou descartar o envolvimento hepático na génese da hipoalbuminémia, quantificam-se os níveis séricos das enzimas ALT, aspartato amino-transferase (AST) e FAS, nunca esquecendo que estas duas últimas podem registar um aumento devido a anterior administração de corticosteróides e que na maioria dos casos, a medição de ALT é suficiente (Ciaramella & Corona, 2003a).

7.2. Visualização dos parasitas por microscopia óptica

A observação microscópica directa de amastigotas através da análise de esfregaços preparados com material biológico ou de cortes histológicos continua a ser o método clássico mais utilizado de confirmação do diagnóstico de LCan (Miró *et al.*, 2008). Para a realização dos esfregaços utiliza-se material recolhido por punção de linfonodos, medula óssea, pele, baço ou fígado para coloração pelos métodos de Wright, Giemsa, Diff-Quick ou Leishman.

Para a observação histopatológica utilizam-se biopsias de pele ou de outros órgãos afectados. O material biológico é fixado em formol a 10% e posteriormente é feita a inclusão em parafina e normalmente empregam-se técnicas imunohistoquímicas para a detecção do parasita. As lâminas são então observadas com uma ampliação de 1000x com óleo de imersão. Os amastigotas podem ser observados dentro dos macrófagos parasitados ou no meio extra-celular (Gomes, Cavalcanti, Lira, Abath, & Alves, 2008). A observação

microscópica de esfregaços de linfonodos, de medula óssea ou de ambos tem especificidade de 100%, a detecção do parasita depende obviamente, da experiência do observador e do tempo dispendido com as observações. Em casos de LCan sintomática podem observar-se grandes quantidades de parasitas, embora a observação de apenas uma célula parasitada se considere um resultado positivo (Saridomichelakis *et al.*, 2005a). A sensibilidade da observação de esfregaços fica muito aquém do ideal - 7,8% a 27,6% - quando se analisam amostras de pacientes infectados assintomáticos onde a carga parasitária é menor. Assim, a impossibilidade de observar amastigotas microscopicamente, não exclui a infecção, principalmente em cães infectados assintomáticos (Oliva *et al.*, 2006). Embora o seu uso não esteja muito difundido, o emprego de métodos imunohistoquímicos em amostras de tecidos tem boa sensibilidade em casos sintomáticos, principalmente quando uma alteração histológica é compatível com as lesões de LCan. Este método pode ainda aumentar a capacidade de detecção de amastigotas em tecidos com baixas cargas parasitárias (Miró *et al.*, 2008).

7.3. Cultura de leishmanias e xenodiagnóstico

Os métodos de observação indirecta através da cultura ou inoculação de parasitas em animais de laboratório têm boa especificidade mas são usados apenas para fins de investigação (Gomes *et al.*, 2008).

7.4. Detecção de anticorpos anti-*leishmania*

Os testes serológicos baseiam-se na detecção de anticorpos, resultantes da resposta humoral desenvolvida pelos canídeos infectados com *Leishmania*. Os testes qualitativos como os imunocromatográficos com antígenos purificados ou recombinantes, detectam anticorpos presentes no soro do animal infectado. Têm a vantagem de serem rápidos, acessíveis e poderem ser utilizados no local, mas a sua sensibilidade é baixa nas infecções assintomáticas e embora a sua especificidade seja satisfatória tem baixo valor preditivo negativo (Miró *et al.*, 2008). Como testes serológicos quantitativos existem o teste de Imunofluorescência indirecta (IFI), o Teste de aglutinação directa (DAT), e o “Enzyme linked immunoabsorbent assay” (ELISA), Dot-ELISA e Western blot. De entre os imunoensaios é o Western Blot o que oferece os melhores resultados, o tipo de teste mais difundido é o de IFI, pois permite a avaliação do estado imunitário dos pacientes infectados durante o tratamento e o teste ideal para estudos de sero-prevalência de campo é o ELISA (Miró *et al.*, 2008).

O teste de IFI detecta anticorpos no soro de cães infectados. Se o soro analisado contiver anticorpos anti-*leishmania*, estes ligam-se aos promastigotas presentes na preparação que se tornam detectáveis através da fluorescência emitida. Dependendo do laboratório utilizam-

se diferentes titulações como limiar de positividade. Embora este teste seja especialmente útil na detecção de infectados sintomáticos para os quais apresenta alta sensibilidade, na detecção de infectados assintomáticos a sua sensibilidade é mais baixa (Oliva *et al.*, 2006).

Na tentativa de ultrapassar as limitações ligadas às reacções cruzadas, empregaram-se antígenos recombinantes com epítomos específicos como o rK39. Num estudo comparativo utilizando vários antígenos e combinações de conjugados, o teste ELISA rK39 mostrou ser altamente específico (96-100%) mas revelou baixa sensibilidade (29-65%) na detecção de infectados assintomáticos (Miró *et al.*, 2008). O IFI é o teste mais indicado para o seguimento de animais em tratamento, porque a diminuição da titulação dos anticorpos do soro acompanha geralmente a cura clínica. Tal facto deve-se a grande parte dos sinais clínicos da doença serem causados pela deposição de imunocomplexos, assim, a cura clínica acompanha-se de resultados negativos em testes de IFI a diluições cada vez mais altas. Quando efectuados vários testes durante o seguimento, chegam a obter-se resultados negativos na serologia, o que nem sempre reflecte a cura parasitológica, essa, bastante difícil de alcançar (Baneth & Shaw, 2002).

Quando o teste é realizado pouco tempo após a infecção, ou em cães onde a resposta humoral é fraca ou em cães resistentes à infecção nos quais ainda não se deu a seroconversão, dá resultados negativos. Por este motivo, num cão suspeito de estar infectado com LCan recomenda-se a repetição do teste passados 30 dias ou a utilização de um método de diagnóstico baseado na pesquisa de DNA de leishmania (Baneth *et al.*, 2008).

7.5. Detecção e amplificação de DNA

A tecnologia de PCR tem sido empregue na detecção de leishmanias, baseando-se na amplificação *in vitro* de sequências específicas de nucleótidos do DNA do parasita. Pode utilizar-se a técnica com o objectivo de amplificar o DNA genómico do *Internal space transcriber-1* (ITS-1) dos genes ribossomais ou do DNA do cinetoplasto (kDNA) (Miró *et al.*, 2008). Quando se utiliza como alvo de amplificação rDNA ou ITS-1, o teste revela alta sensibilidade em aspirados de linfonodos e permite a distinção entre espécies e sub-espécies de leishmania após o uso da técnica de RFLP. A sua sensibilidade em amostras de sangue é baixa, devido à pequena quantidade de DNA genómico nas leishmanias quando comparado com a quantidade de kDNA. Um estudo revelou que a técnica de PCR - ITS-1, efectuada em zaragatoas de conjuntiva, tem sensibilidade de 92% e especificidade de 100% na detecção de infectados com *Leishmania*. Esta técnica detectou como positivos cães que haviam sido infectados experimentalmente, 6 semanas antes de serem detectados como positivos nos testes serológicos (Ayali, Jaffe, Burshtain, Gonen, & Baneth, 2004).

O kDNA pode ser detectado por PCR mesmo quando a quantidade de parasitas na amostra é ínfima, o que torna esta técnica mais sensível do que as anteriores e lhe dá a vantagem adicional de poder ser usada num leque de amostras mais vasto (Miró *et al.*, 2008). Estas técnicas são qualitativas, a sua grande desvantagem é o facto de não reproduzirem a carga parasitária presente na amostra analisada. Além disso, um resultado positivo num cão sem sintomatologia, apenas significa que este teve contacto com o parasita, não significa que venha a desenvolver a doença (Baneth *et al.*, 2008). No intuito de ultrapassar as limitações da PCR qualitativa, desenvolveram-se técnicas quantitativas como a “Real Time-PCR” (RT-PCR). Esta técnica detecta a totalidade de DNA presente na amostra, o que permite obter informação acerca da carga parasitária. A técnica com maior sensibilidade é o RT-PCR kDNA, pode ser realizada em amostras de linfonodos, medula óssea, pele, zaragatoas de conjuntiva ou sangue, e é útil no seguimento do paciente e na resposta ao tratamento (Manna *et al.*, 2008).

7.6. Reacção de Montenegro

Este é um teste de imunodiagnóstico que avalia a resposta imune celular específica através de uma reacção de hipersensibilidade do tipo retardado para antígenos de leishmania (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2009). Resultados positivos são obtidos em casos de LV em humanos nos quais foi efectuada uma terapêutica com sucesso ou em casos de infecção resistentes à doença enquanto os resultados negativos se obtêm em casos progressivos de LV. Em cães infectados com *L. infantum*, os resultados da Reacção de Montenegro têm um significado semelhante aos obtidos em humanos, resultados positivos em cães assintomáticos indicam que houve contacto prévio com *Leishmania* e que existe provavelmente um estado de portador (Cardoso L. M., 2004). Este teste consiste na inoculação intra-dérmica do antígeno leishmanina no cão e posterior leitura através da medição do diâmetro da reacção eritematosa e de induração após 72h, tem o inconveniente de necessitar de duas intervenções (inoculação e leitura) (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2009).

Este teste tem potencialidades em conjunto com testes de detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, na avaliação da seroprevalência da infecção em populações caninas em áreas endémicas (Cardoso L. M., 2004).

8. Diagnósticos diferenciais

O polimorfismo clínico laboratorial que caracteriza os casos de LCan, a probabilidade da sintomatologia se manifestar devido a imunossupressão ou afecções concomitantes e a impossibilidade de chegar a um diagnóstico definitivo sem o recurso a métodos laboratoriais apenas disponíveis em certos centros de referência ou que requerem uma despesa adicional para o proprietário (Miró *et al.*, 2008), exige que o clínico comum tenha presente uma lista de diagnósticos diferenciais que lhe permitam objectivamente reconhecer sintomas e alterações laboratoriais que o ajudem na elaboração do diagnóstico de LCan (Ciaramella & Corona, 2003a).

Erlíquiose – doença com curso agudo/sub-agudo/crónico, devida à exposição a ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, vector de *Ehrlichia canis*, parasita de monócitos e macrófagos. Nos quadros mais comuns os cães exibem febre (39,5-40°C), anorexia, depressão, letargia, perda de peso, linfadenomegália, esplenomegália, hemorragias – petéquias, equimoses e epistaxis – e manifestações oculares – uveíte anterior, queratoconjuntivite, hifema, glaucoma, corio-retinite e descolamento da retina. Claudicação devido a poliartrite, membranas mucosas pálidas e sinais neurológicos associados a meningite acompanham também os quadros atípicos de Erlíquiose. Os dados laboratoriais incluem trombocitopénia em 80% dos animais, embora também se possa revelar anemia, leucopénia, pancitopénia severa, aumento das enzimas hepáticas, de BUN e de creatinina e hiperglobulinémia em alguns casos (Ettinger & Feldman, 1992; Baneth, 2009b).

Babesiose – doença com curso hiperagudo/agudo/crónico, devida à exposição aos ixodídeos vectores *Dermacentor reticulatus* para *Babesia canis*. Estes protozoários são parasitas intracelulares de eritrócitos. O quadro da infecção por *Babesia canis* apresenta febre, letargia, anorexia, membranas mucosas pálidas, anemia regenerativa, hemoglobinúria, e aumento de APTT. Além dos quadros mais típicos, podem ainda aparecer nas babesioses icterícia, esplenomegália, petéquias, CID, resultado positivo ao teste de Coombs e níveis séricos de bilirrubina aumentados (Ettinger & Feldman, 1992; Baneth, 2009f).

Borreliose – doença com curso agudo/sub-agudo/crónico, devida à exposição a ixodídeos do género *Ixodes*, vector de *Borrelia burgdorferi*. A sintomatologia inclui febre (39,5 – 40,5°C), claudicação e aumento de volume da articulação devido a poliartrite, mialgia e linfadenomegália. Formação de auréola vermelha no local de picada do ixodídeo que desaparece precocemente. O quadro clínico acompanha-se também de anorexia, fraqueza, insuficiência renal aguda (IRA) progressiva devido a glomerulopatia com perda de proteínas e meningite (Ettinger & Feldman, 1992).

Dirofilariose – doença com curso crónico, devida à exposição a mosquitos dos géneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes*. A infecção por *Dirofilaria repens* provoca sinais clínicos leves como tumefacção da pele, hiperpigmentação e granulomas sub-cutâneos que contêm vermes adultos. *Dirofilaria immitis* provoca uma sintomatologia mais exuberante, os sinais clínicos resultam duma endo-arterite crónica causada pelas formas adultas do parasita que se alojam na parte direita do coração, nas artérias pulmonares e na veia cava caudal. As alterações vasculares progressivas conduzem a hipertensão pulmonar, hipertrofia ou dilatação ventricular direita e “cor pulmonale”. Os primeiros sinais clínicos são tosse e intolerância ao exercício e estes são seguidos por sinais de insuficiência cardíaca direita: hepatomegália, ascite, síncope e sinais respiratórios como dispneia, taquipneia, tosse e hemoptise (Ettinger & Feldman, 1992). Casos de curso mais agudo com maior quantidade de vermes podem causar síndrome de veia cava com ruptura da membrana eritrocitária e crises hemolíticas. A adicionar ao quadro clínico da infecção por *D. immitis*, os cães infectados demonstram ainda uma resposta imunitária específica contra *Wolbachia* sp., uma bactéria Gram-negativa endossimbionte que se encontra em grande quantidade na hipoderme, órgãos reprodutores femininos, oócitos e embriões de *D. immitis* (Baneth, 2009d).

Hepatozoonose – doença de curso sub-agudo/agudo, devida à exposição a ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, vector de *Hepatozoon canis* em Portugal. Parasitas das células do SMF. Os quadros clínicos mais severos apresentam anemia, caquécia e letargia extremas, provocadas por altas cargas parasitárias que por vezes se acompanham de leucocitose devida à intensa neutrofilia. Febre, perda de peso, prostatite parasitária, anemia, linfadenomegália e hiperglobulinémia são sinais que acompanham estes quadros (Ettinger & Feldman, 1992). Outros sinais menos comuns são dor óssea, mialgias e descarga ocular purulenta que por outro lado aparecem mais frequentemente associados à infecção por *H. americanum* no sudeste dos Estados Unidos (Baneth, 2009a).

Linfoma maligno – doença de curso sub-agudo/crónico, quadro clínico com linfadenopatia sistémica ou regional, perda de peso, membranas mucosas pálidas, esplenomegália, envolvimento hepático, diarreia, linfócitos atípicos na medula óssea e linfonodos, actividade sérica de ALT, AST e FAS aumentada, níveis séricos de cálcio e bilirrubina aumentados (Ciaramella & Corona, 2003a).

Alergia alimentar – doença de curso crónico, sem prurido sazonal, com eritema, pápulas, placas, úlceras, liquenificação, hiperpigmentação, alopecia auricular, dorsal, da parte distal das axilas e da cabeça, piodermatite auto-infligida e possível eosinofilia. Efectuar testes com alimentos hipoalérgicos para descartar a doença (Ciaramella & Corona, 2003a).

Dermatite alérgica à picada de pulga – doença de curso sub-agudo/crónico/sazonal, com presença de pulgas, prurido sazonal, eritema difuso das regiões inguinal, perianal e lombar, pelos partidos, piodermatite auto-inflingida, liquenificação, hiperpigmentação, presença de dejectos de pulga na pele e pelo, teste intradérmico com resultado positivo ≥ 2 (Ciaramella & Corona, 2003a).

Atopia – doença de curso crónico, com alopecia peri-ocular, prurido, lambadura dos membros, espirros, epífora, otite externa, inflamação das glândulas peri-anais (Ciaramella & Corona, 2003a).

Demodicose – doença de curso sub-agudo/crónico, animais jovens são os mais frequentemente afectados. Quadro clínico caracterizado por alopecia, crostas, eritema peri-ocular, foliculite pustular difusa geralmente sem prurido, furunculose, pododermatite, presença de exemplares de *Demodex canis* em produto de raspagem cutânea (Mozos *et al.*, 1999; Ciaramella & Corona, 2003a).

Sarna sarcóptica – doença de curso sub-agudo/crónico, animais jovens ou imunodeprimidos são os mais frequentemente afectados. Lesões axilares, inguinais, faciais ou difusas (pápulas e escaras), espécimes de *Sarcoptes scabiei* em produto de raspagem cutânea (Ciaramella & Corona, 2003a).

Dermatofitose – doença de curso sub-agudo/crónico, caracterizada por prurido, alopecia anular multi-focal mas raramente generalizada, piodermatite auto-infligida, pododermatite, foliculite, crostas, seborreia, exame com lâmpada de Wood produz coloração amarela-esverdeada, exame microscópico dos pêlos partidos pode revelar hifas e esporos (Roze, 2005).

Lupus Eritematoso Sistémico – doença de curso crónico. Nesta doença o animal desenvolve naturalmente auto-anticorpos contra proteínas nucleares, desenvolvendo uma reacção de hipersensibilidade tipo III devido aos imunocomplexos formados. Estes imunocomplexos acumulam-se nas zonas de estreitamento dos pequenos vasos provocando assim lesões de vasculite, o que causa anóxia nos tecidos irrigados pelos vasos lesionados. Os vasos afectados são tipicamente os dos rins, cápsulas articulares, e pontos de pressão na pele, (locais de estreitamento dos vasos onde os imunocomplexos se acumulam). As lesões causadas pela deposição de imunocomplexos provocam uma nefropatia com perda de proteína, poliartropatia e lesões cutâneas. Estas últimas visualizam-se geralmente nos dígitos, bordos do pavilhão auricular e locais da pele que recobrem proeminências ósseas. Podem observar-se pequenas lesões alopécicas, eritematosas e com descamação que evoluem para lesões crostosas e ulcerativas. Muitas vezes pode observar-se anemia,

geralmente de carácter hemolítico mas também por vezes não regenerativo e trombocitopénia (Roze, 2005; Miller, 2009).

8.1. Afecções concomitantes

Na prática clínica, o Médico Veterinário depara-se por vezes com situações em que o mesmo hospedeiro se encontra infectado por mais que um agente etiológico. A patogénese das doenças concomitantes não é totalmente compreendida e envolve vários mecanismos relacionados com a transmissão, a invasão do hospedeiro e da célula, a resposta imunitária e a multiplicação e disseminação dos agentes patogénicos (Graham, Cattadori, Smith, Ferrari, & Bjornstad, 2007).

A transmissão e inoculação em simultâneo de vários agentes patogénicos, licita respostas no hospedeiro ainda mais diversas que aquelas lidadas por um único agente, que podem entrar em conflito ou exacerbar-se mutuamente, permitindo que os agentes patogénicos, de modo sinérgico, colonizem com mais sucesso o hospedeiro infectado.

Podem ser compreendidos três mecanismos diferentes pelos quais dois agentes patogénicos se instalam e interagem em co-infecção. Pode haver sinergismo entre dois agentes patogénicos que isoladamente causam uma infecção leve a moderada e que em co-infecção levam a uma doença mais severa. Pode haver indução de doença severa, causada por um agente patogénico que normalmente causa uma doença leve, provocada por um agente concomitante altamente patogénico ou imunossupressivo. Pode ainda existir indução de doença extremamente severa, pela acção sinérgica da co-infecção de dois agentes altamente patogénicos.

Considerações adicionais há ainda a ter nas doenças provocadas por agentes transmitidos por vectores artrópodes. Embora as co-infecções possam ser transmitidas em simultâneo, normalmente há uma que precede a outra. A presença duma infecção pode facilitar a expansão e disseminação duma infecção latente, ou por outro lado permitir o estabelecimento duma nova infecção, a qual seria normalmente eliminada pelos mecanismos de defesa imunitária (Baneth, 2009c).

A Erliquiose monocítica canina e a LCan são doenças transmitidas por vectores, de grande importância e com distribuição mundial. Os agentes patogénicos, *Ehrlichia canis* e *Leishmania infantum* são parasitas intracelulares que têm os monócitos e macrófagos como as suas células hospedeiras. A epidemiologia destas duas doenças expande-se em conjunto em algumas regiões do mundo, porque a actividade de ambos os vectores e de ambas as épocas de transmissão são similares. Num estudo recente, foram alojados 43 cães numa área endémica de ambas as doenças no sul de Itália, e estes foram seguidos durante duas épocas de transmissão. Trinta e quatro cães que contraíram Erliquiose também desenvolveram LCan. A sintomatologia causada pela infecção por *E. canis* precedeu a

evidência de sintomatologia da LCan em 28 cães (82%), acrescido ao facto de que os casos sintomáticos foram mais frequentes nos cães com co-infecção do que naqueles que apenas contraíram uma das infecções. Concluiu-se que a infecção por *E. canis* pode ter sido um factor que contribuiu para o estabelecimento da sintomatologia da LCan (Mekuzas *et al.*, 2009).

Três casos clínicos de co-infecção por *Demodex canis* e *Leishmania* spp. foram diagnosticados em Espanha e descritos num artigo científico da autoria de Mozos, Pérez, Day, Lucena e Ginel (1999). Os canídeos apresentavam-se com lesões de alopecia difusa, crostas, foliculite e furunculose que faziam lembrar as lesões típicas de demodicose generalizada complicadas por piodermatite secundária. A patogénese do desenvolvimento da afecção em adultos não está bem esclarecida. A forte predisposição de certas raças e a associação entre a demodicose generalizada e factores imunossupressivos, como distúrbios endócrinos, estro, parto, corticoterapia e quimioterapia, sugere que a combinação de factores hereditários e imunossupressivos desempenha um papel patogénico importante. Microscopicamente podia apreciar-se uma dermatite granulomatosa difusa e peri-folicular, superficial e profunda e em dois dos casos puderam observar-se tanto os ácaros de *Demodex canis* como os amastigotas de *Leishmania* spp nas mesmas lesões. Nos três casos, a escassez de linfócitos CD3+ imunorreactivos observados, geralmente abundantes em infecções por *D. canis*, apontam para uma imunossupressão celular induzida pela infecção por *Leishmania* spp., como um factor predisponente para a demodicose generalizada (Mozos *et al.*, 1999).

Frequentemente, as co-infecções apresentam-se com sinais clínicos mais severos que as infecções por um só agente, a possível ausência de sinais específicos que diferenciem os agentes co-infectantes podem confundir e impossibilitar a detecção de todos os agentes envolvidos na doença. A sequência de eventos que levam à doença apresentada como co-infecção pode não ser possível de traçar a menos que tenham sido efectuados testes específicos antes da infecção pelo segundo agente infectante. O correcto diagnóstico e manejo duma co-infecção pode por vezes não ser fácil porque muitas vezes uma infecção salta à vista enquanto a outra pode à primeira ser menos óbvia. Diferentes infecções podem apresentar sinais clínicos semelhantes e muitas vezes não específicos. O clínico tem que se esforçar para pensar na possibilidade de co-infecção e para que o diagnóstico seja efectuado correcta e atempadamente, uma vez que uma infecção concomitante pode comprometer a eficácia da terapêutica instaurada (Baneth, 2009c).

9. Tratamento

9.1. Tratamento etiológico

9.1.1. Antimoniais pentavalentes

Estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumine são utilizados como drogas de primeira linha no tratamento de LCan (Noli & Auxilia, 2005) e LV. Estes compostos actuam inibindo selectivamente as enzimas das leishmanias necessárias às reacções glicolíticas e de oxidação de ácidos gordos. A biodisponibilidade do antimoniato de meglumine após administração via intramuscular (IM) e via subcutânea (SC) é de 91,7 e 92,2% respectivamente, e 80% é excretado na urina 9h após a sua administração. A posologia recomendada é de 100 mg/kg de peso vivo (pv) a cada 24 horas (SID) durante 3-4 semanas e a via SC é a preferencialmente utilizada. Alguns estudos farmacocinéticos demonstraram que a dose de 75 mg/kg pv a cada 12 horas (BID) pode atingir concentrações plasmáticas mais elevadas. A via IM é desaconselhada pelos efeitos colaterais que pode causar, como a formação de abscessos e fibrose muscular. Os efeitos colaterais devidos à utilização de compostos antimoniais incluem dor no local de injeção e nefrotoxicidade. Devido à glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos ser um processo patológico bastante comum em cães com LCan, e à nefrotoxicidade que se pode desenvolver com a administração destes compostos, a função renal é um parâmetro que deve ser cuidadosamente avaliado antes e durante o tratamento. A suspensão do tratamento é aconselhável quando os parâmetros renais se encontram acima dos valores fisiológicos (Baneth & Shaw, 2002).

Foi utilizado num estudo efectuado no Brasil, um tratamento com antimoniato de meglumine em lipossomas, em cães naturalmente infectados com *L. chagasi*. Este estudo foi efectuado com o intuito de determinar a eficácia do composto em relação à remissão de sintomas, diminuição da carga parasitária, capacidade infectante para o vector e ocorrência de efeitos colaterais. O estudo demonstrou melhoras nos sintomas dos animais no grupo tratado com os lipossomas contendo antimoniato, diminuição da carga parasitária cinco meses após o final do tratamento e diminuição da taxa de infecção para o vector (0,65%), quando comparada com a taxa de infecção para o vector no grupo controlo. Apesar de não terem sido registadas alterações a nível da função hematopoiética, renal e hepática, registaram-se efeitos colaterais transitórios nos quinze minutos posteriores à injeção IV em ambos os grupos tratados com lipossomas, como prostração, defecação, taquipneia e sialorreia, denominada de reacção induzida pelo lipossoma mediada pelo complemento (Ribeiro *et al.*, 2008).

9.1.2. Alopurinol

Esta droga é uma hipoxantina de administração oral que ao ser metabolizada pela *Leishmania* produz um análogo inactivo da inosina. Quando incorporada no Ácido ribonucleico (RNA) das leishmanias induz alterações na transcrição proteica. Não possui propriedades leishmanicidas mas impede a multiplicação das leishmanias. O principal efeito colateral do alopurinol é a capacidade de promover xantínúria e levar à formação de urólitos de xantina aquando da sua administração a longo prazo (Baneth & Shaw, 2002; Ciaramella & Corona, 2003b). Esta droga está mundialmente difundida no tratamento da LCan, é utilizada como agente terapêutico único mas a sua eficácia aumenta quando associada ao tratamento com antimoniais. Tem como vantagens a administração oral e o seu baixo custo. As doses utilizadas variam de 15-30 mg/kg SID/BID *per os* (PO), é utilizado em tratamentos de longa duração com o objectivo de evitar recaídas da condição clínica (Noli & Auxilia, 2005).

9.1.3. Anfotericina B

É um antibiótico macrólido que se liga preferencialmente ao ergosterol presente nas membranas plasmáticas, alterando a permeabilidade ao ião potássio, a sua potência contra parasitas do género *Leishmania sp* é cerca de 400 vezes superior à dos antimoniais. Tem menos afinidade para as membranas plasmáticas dos mamíferos devido ao colesterol ser o esteróide presente em maior quantidade nas suas células mas causa nefrotoxicidade através do efeito vasoconstritor que causa a nível renal e da sua possível acção directa sobre as células epiteliais renais (Ciaramella & Corona, 2003b). Outros efeitos colaterais incluem febre, anorexia, vômito e periflebite. É a droga de escolha no tratamento da LV em casos de co-infecção com o vírus HIV e em casos de resistência aos antimoniais. No tratamento de LCan é geralmente reservada para os casos que apresentam resistência aos antimoniais e é administrada na dose de 0,5-0,8 mg/kg pv via endovenosa (EV) duas ou três vezes por semana até se atingir uma dose acumulada de 8 a 15 mg/kg. Este protocolo exige uma monitorização muito estreita da função renal, se os valores séricos de Creatinina subirem acima de 2,5 mg/dl o tratamento tem de ser interrompido (Baneth & Shaw, 2002; Noli & Auxilia, 2005). Os problemas da nefrotoxicidade que se verificaram com o uso desta substância foram ultrapassados com a sua incorporação em lipossomas, os quais permitem a administração de doses mais altas (3 mg/kg pv EV) com redução drástica dos efeitos colaterais. O melhor protocolo é conseguido com as seguintes posologias: administração nos dias 1, 2, 3 e 10 ou 1, 2, 3, 4 e 10. O tratamento de LCan com anfotericina B é desaconselhado devido à sua ineficácia para atingir a cura parasitária e a consequente possibilidade da criação de resistências por parte das leishmanias a uma das principais e mais potentes drogas utilizada no tratamento da LV (Ciaramella & Corona, 2003b).

9.1.4. Aminosidina

O mecanismo de acção deste antibiótico é levado a cabo através da modulação duma proteína transportadora da membrana que permite alcançar altas concentrações intracelulares deste aminoglicosídeo. Uma das pautas terapêuticas mais utilizadas prevê a administração de 5,25 mg/kg pv SC BID durante três semanas. Os principais efeitos colaterais que aparecem num número reduzido de animais incluem ototoxicidade e nefrotoxicidade, pelo que este antibiótico aminoglicosídeo está contra indicado em pacientes com função renal afectada (Ciaramella & Corona, 2003b; Miró *et al.*, 2008).

9.1.5. Pentamidina

Este composto é uma diamida com marcada acção anti-fúngica e anti-protozoária que tem a capacidade de lesar o DNA das leishmanias. É uma droga que apresenta efeitos colaterais agudos (hipotensão, náusea, vômito, sialorreia, diarreia e choque anafilático) e crónicos (hipoglicémia, diabetes, lesão hepato-renal e trombocitopénia). No tratamento da LCan, a pentamidina é utilizada como alternativa ou em associação com os compostos antimoniais embora não esteja provado que desta associação advenham efeitos sinérgicos eficazes. A dosagem sugerida é de 4 mg/kg pv IM em dias alternados por três a quatro semanas, quando em associação com antimoniais, ambas as drogas são alternadas diariamente durante 24 a 30 dias (Ciaramella & Corona, 2003; Noli & Auxilia, 2005).

9.1.6. Miltefosina

Este composto é uma alquilofosfocolina activa da membrana que se acumula nos macrófagos, de administração oral. Não só é directamente tóxica para as leishmanias como também promove a activação de macrófagos e células T e produção de substâncias microbicidas intermediários de oxigénio e azoto reactivos (Baneth & Shaw, 2002; Miró *et al.*, 2008). Um estudo multicêntrico levado a cabo em dezassete clínicas e três universidades europeias, incluiu 82 cães com sintomatologia de LCan confirmados por PCR, IFI e/ou exame parasitológico microscópico que foram medicados com uma solução oral de miltefosina a 2% na dose de 2 mg/kg SID misturado na refeição durante 28 dias. Não foram efectuados quaisquer tratamentos adicionais. Neste estudo, 61% dos animais submetidos à terapêutica apresentaram redução da sintomatologia até após um mês do fim do tratamento, 51,5% dos cães apresentaram cura parasitológica 56 dias após o início do tratamento. Na opinião dos investigadores em 82,7% dos cães, o tratamento com miltefosina foi retrospectivamente tão ou mais eficaz que as terapêuticas convencionais utilizadas para a LCan (Woerly, Maynard, Sanquer, & Médaille 2006).

9.1.7. Imidazóis

O antifúngico ketoconazol foi utilizado para o tratamento de 14 cães com LCan num estudo em que a dose de 7 mg/kg pv SID foi administrada PO durante treze semanas, devido às suas conhecidas propriedades anti-leishmania *in vitro* e ao seu uso para o tratamento de LV, principalmente no Quênia. Neste estudo, 71% dos cães atingiram a remissão clínica completa ou quase completa, no entanto não há registos de seguimento dos casos após o final do tratamento (Baneth & Shaw, 2002; Miró et al., 2008).

O metronidazol foi utilizado em dois estudos (Noli & Auxilia, 2005). Num em combinação com espiramicina onde entraram 27 cães, 13 dos quais foram medicados com uma dose de metronidazol de 25 mg/kg pv SID e 150.000 UI/kg pv SID de espiramicina PO durante treze semanas, enquanto os 14 cães do grupo controlo foram tratados com antimoniato de meglumine e alopurinol. No grupo de teste, foi afastado 1 cão por desenvolver *pemphigus foliaceus*, dos que completaram o tratamento (12), 10 mostraram remissão completa ou quase completa dos sintomas, embora não se tivesse obtido nenhum resultado negativo ao PCR. No grupo controlo, foram afastados 4 cães devido a efeitos secundários da terapêutica, dos que completaram o tratamento (9), 8 mostraram remissão completa ou quase completa dos sintomas embora, embora nenhum tenha sido PCR negativo. Os cães do grupo controlo começaram a demonstrar melhoras do estado geral após uma média de 30 dias, enquanto no grupo de teste não se verificaram melhoras nos sintomas dos cães até uma média de 45 dias (Pennisi et al., 2005).

No segundo estudo foi administrado metronidazol na dose de 10 mg/kg em combinação com enrofloxacina na dose de 20 mg/kg pv PO a 12 dos 36 cães incluídos. Noutro grupo, 12 cães receberam enrofloxacina com a mesma dosagem e os animais do grupo controlo foram tratados com antimoniato de meglumine e alopurinol. A duração do tratamento para todos os grupos teve a duração de quatro semanas. Em 70% dos cães do grupo tratado com a associação medicamentosa e em 50% dos do grupo tratados apenas com enrofloxacina houve remissão completa ou quase completa dos sintomas, embora ambos os grupos tenham registado uma taxa de recaídas de 50% dos casos depois de 3 meses de finalizado o tratamento (Noli & Auxilia, 2005; Miró et al., 2008). O uso dos imidazóis no tratamento de LCan é bastante limitado pelos efeitos secundários indesejados que muitas vezes provocam como o vómito, anorexia e hepatotoxicidade hepática (Ciaramella & Corona, 2003b).

9.1.8. Trifluralina em lipossomas

Este composto é uma dinitroanilina com comprovada actividade anti-leishmania *in vitro* que foi recentemente utilizado num estudo efectuado em Portugal para o tratamento de 5 cães da raça Beagle infectados experimentalmente com amastigotas de *L. infantum*. Seis meses após a infecção ter sido comprovada com PCR de vários tecidos, IFI e expressão de

citoquinas, foi administrado o tratamento com Trifluralina lipossomal na dose de 10 mg/kg pv EV SID durante 10 dias. Após o tratamento os animais mostraram remissão dos sinais clínicos que se relacionaram com a redução da carga parasitária e a expressão de RNA mensageiro (mRNA) de citoquinas típicas duma resposta Th1 protectora, embora não se tenha verificado a diminuição do título de anticorpos anti-leishmania (Marques *et al.*, 2008) Actualmente, os tratamentos de primeira linha no tratamento da LCan na Europa incluem o antimoniato de meglumine, o alopurinol, a associação terapêutica destas duas drogas e a anfotericina B, todas as demais são consideradas como agentes terapêuticos de segunda linha. Mesmo com o vasto arsenal disponível, nenhum dos medicamentos utilizados no tratamento da LCan é 100% eficaz a ponto de atingir a cura parasitológica e embora se consiga atingir a cura sintomática, muitas vezes a terapêutica não evita recidivas ou re-infecções (Miró *et al.*, 2008).

9.2. Tratamento imunomodulador

Os imunomoduladores dividem-se em imunoestimulantes ou imunossupressores de acordo com o seu principal efeito terapêutico.

9.2.1. Imunossupressores

Os corticosteróides são os imunossupressores mais utilizados na terapêutica da LCan, sempre associados a terapêutica específica quando a sintomatologia derivada da formação e deposição de imuno-complexos (poliartrite, uveíte, glomerulonefrite) é exuberante e o tratamento específico não é eficaz na redução da sintomatologia. No entanto, estes ficam reservados para as formas menos severas da doença em que a deposição dos imunocomplexos ainda não causou danos irreversíveis (Insuficiência renal irreversível) (Ciaramella & Corona, 2003b).

No seguimento dos estudos de Terrazano (2006) em que foi demonstrada a presença de IgM ligadas às membranas das plaquetas assim como certos isótopos de IgG, em cães naturalmente infectados com LCan e sendo este um dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelos distúrbios da coagulação que os pacientes com LCan apresentam, foi realizado um estudo em Itália com o intuito de avaliar o papel da administração de prednisona oral associada ao tratamento clássico da LCan. Neste estudo foram incluídos 30 cães naturalmente infectados e com sintomatologia de LCan mas que não apresentavam distúrbios hemorrágicos e foram também incluídos 10 cães saudáveis num grupo controlo. Os cães com LCan foram divididos aleatoriamente em dois grupos, o grupo 1 recebeu o tratamento com antimoniato de meglumine e alopurinol durante 30 dias e o grupo 2 recebeu o mesmo tratamento e ainda prednisona na dose de 2 mg/kg pv SID durante os sete primeiros dias de tratamento, depois na dose 1 mg/kg pv SID durante mais sete dias e

posteriormente na dose de 0,5 mg/kg pv SID. Antes do início do tratamento foi efectuado o exame clínico, foi determinada a agregação plaquetária, factores de coagulação e parâmetros bioquímicos. Este protocolo foi repetido aos dias 15, 30 e 60 após o início do tratamento. Em ambos os grupos em tratamento, a agregação plaquetária revelou ser mais baixa que no grupo controlo até ao fim do estudo. Um significativo aumento foi registado no grupo 1 ao fim de 60 dias mas apenas ao fim de 15 no grupo 2. Este estudo sugere que a prednisona como tratamento imunossupressivo pode ser uma ferramenta útil no tratamento dos distúrbios da coagulação associados à LCan (Cortese *et al.*, 2008).

9.2.2. Imunoestimulantes

Com este tipo de agentes terapêuticos procura-se restaurar a resposta imunitária celular e em particular a capacidade de fagocitose dos macrófagos parasitados. Este efeito pode ser obtido com o uso de determinadas citocinas ou com o uso de compostos que favoreçam a sua produção. O INF- γ é das citocinas disponíveis a que oferece uma das melhores perspectivas no tratamento de LCan (Vouldoukis, *et al.*, 1996; Baneth *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, 2009). A Prolactina, a hormona hipofisária cuja função principal é estimular a produção de leite em mamíferos é hoje classificada como uma citocina pró-inflamatória derivada do linfócito, o aumento da sua concentração sérica provoca o aumento das subclasses de linfócitos CD4+Th1 e aumento da libertação de IL-2, IL-12, INF- γ e TNF- α que levam à activação de células *natural killer* e macrófagos, seguido do decréscimo das subclasses de linfócitos CD4+Th2 e TNF- β (Ciaramella & Corona, 2003b).

Baseado nestes factos e em estudos anteriormente realizados em hamsters (*Mesocricetus auratus*), em que foi proposto o papel protector da lactação na leishmaniose murina, foi efectuado um estudo em cães naturalmente infectados com LCan, usando como tratamento domperidona. A Domperidona é um antagonista dos receptores D2 da dopamina que provoca a libertação de serotonina, esta por sua vez estimula a produção de prolactina. Neste estudo, 98 cães foram tratados unicamente com domperidona na dose de 1 mg/kg pv PO BID durante um mês. A sintomatologia, a bioquímica sanguínea, a serologia e os exames imunológicos foram avaliados durante 12 meses após o início do tratamento. A Domperidona foi eficaz no controlo de sinais clínicos e titulação de anticorpos, foi observado uma redução significativa dos níveis de anticorpos em 74,3% dos animais com sinais clínicos leves e 40% destes cães tornaram-se seronegativos. Nos animais com vários sinais clínicos e com titulações de anticorpos mais elevadas, a melhoria da sintomatologia ocorreu em 80% e a redução das titulações de anticorpos em 38%. Notou-se ainda na totalidade dos cães um aumento significativo da resposta imune celular medido através do teste de Montenegro e do ensaio da proliferação de linfócitos (Ochoa *et al.*, 2009).

9.3. Tratamento de suporte

A IRC é das piores e mais frequentes complicações que um canídeo com LCan enfrenta. Desenvolve-se com a progressão da glomerulonefrite causada pela deposição de imunocomplexos. Nos casos que apresentam graus menos avançados de IRC, a dose do agente quimioterapêutico deve ser reduzida e/ou o intervalo de administração aumentado e deve evitar-se o uso daqueles que provocam maior nefrotoxicidade (anfotericina B, pentamidina e aminosidina). Além destas medidas é conveniente indicar uma dieta com baixos níveis de proteína, sódio, fósforo, purinas e suplementada com anti-oxidantes. Em casos mais avançados é necessário efectuar uma fluidoterapia adequada para restabelecer o equilíbrio hidro-electrolítico e estimular a diurese e a excreção de catabólitos azotados (Ciaramella & Corona, 2003b).

Os agentes antiácidos como os inibidores da bomba de prótons e os antagonistas dos receptores H₂ da histamina podem ser úteis no manejo do vômito associado a IRC. O sucralfato, além de protector da mucosa gastrointestinal ajuda a impedir a absorção de fósforo, embora para estes fins existam os quelantes orais deste mineral. A concentração sérica de fósforo eleva-se em muitos casos terminais de IRC (Miró, 2005), os quelantes orais deste mineral são úteis na medida em que diminuem a absorção de fósforo. No manejo da hipertensão associada a IRC está indicado o uso dos bloqueadores dos canais de cálcio e os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA's) (Roze, 2005). Para o catabolismo proteico excessivo que acompanha os casos mais graves de LCan utilizam-se esteróides anabolizantes que também são úteis no manejo da anemia. Dependendo da etiopatogenia da anemia, os tratamentos com eritropoietina, ácido fólico e vitaminas do complexo B também se revelam úteis (Ciaramella & Corona, 2003b). No manejo dos estados hipercoaguláveis, como a CID e a formação de trombos muitas vezes presentes em casos com síndrome nefrótica, a aspirina em doses baixas, a warfarina e a estreptoquinase são drogas a adicionar ao arsenal terapêutico (Félix *et al.*, 2008).

10. Profilaxia

10.1. Vacinas

O desenvolvimento de uma vacina que seja efectiva no desenvolvimento duma resposta imunitária que impeça a infecção dos canídeos que são expostos aos parasitas de leishmanias é efectivamente um avanço significativo naquilo que ultimamente se tem investigado no campo da LCan. Neste momento existem vacinas em fase de estudo de campo e já foi licenciada uma para comércio no Brasil. Nos estudos já realizados, além do antígeno propriamente dito, é de notar que o adjuvante utilizado tem um importante papel na capacidade de protecção induzida por uma vacina (Miró *et al.*, 2008).

10.1.1. Vacinas de 1ª geração

As vacinas mortas contra *Leishmania* consistem em promastigotas inactivados e são conhecidos como vacinas de 1ª geração. Uma vacina constituída por promastigotas de *L. braziliensis* inactivados por disrupção sónica e o uso de mertiolato, contendo o agente da vacina contra a tuberculose (BCG) como adjuvante mostraram boa protecção contra infecções experimentais com *L. infantum*. Promastigotas de *L. major* precipitadas com alumínio, autoclavadas, com adjuvante de BCG foram testadas em cães que foram seguidos serologicamente durante dezasseis meses e mostraram uma diminuição da taxa de seroconversão de 69% quando comparados com cães controlo (Miró *et al.*, 2008).

10.1.2. Vacinas de 2ª geração

Vacinas de fracções purificadas de *Leishmania* que incluem a totalidade do organismo cultivado ou as suas macromoléculas de excreção-secreção, são as vacinas de 2ª geração. Uma das macromoléculas mais utilizadas no fabrico deste tipo de vacinas é a fracção enriquecida da glicoproteína GP63 também conhecida como ligando fucose-manose (FML), de *L. donovani*. Uma vacina baseada no FML foi objecto de alguns estudos no Brasil, que revelaram uma taxa de eficácia na ordem dos 80% e foi licenciada como a primeira vacina anti-LCan neste país. O uso desta vacina foi proposta para o bloqueio de transmissão da infecção e como tratamento de cães infectados, no entanto, a diferenciação entre cães infectados e vacinados é ainda uma tarefa de difícil realização (Torres, 2006).

Foi efectuado no ano de 2009 um estudo, também no Brasil com o objectivo de tentar encontrar testes que pudessem ser úteis para diferenciar os animais infectados dos vacinados. Para tal, utilizaram-se amostras de sangue periférico de 100 cães infectados com LCan, para as quais o teste de PCR apresentou uma sensibilidade de 91%.

Do total, 20 cães foram vacinados com o antígeno k39 presente na vacina do FML e passados dez dias os soros dos vacinados foram testados com o antígeno K39 e 10% do

grupo mostrou serorreactividade contra este antígeno. No final da vacinação, os exames de medula óssea foram negativos sugerindo que a positividade de 10% dos cães vacinados pode ser devido a uma reacção cruzada, donde se concluiu que o PCR e a serorreactividade frente a k39 podem ser utilizados para o diagnóstico definitivo de LCan com 90% de sensibilidade em áreas em que a vacina tenha sido utilizada (Lima et al., 2009). Uma outra vacina baseada em fracções purificadas de antígenos foi testada em França, onde uma boa protecção contra a infecção experimental por *L. infantum* foi atingida. Esta vacina contém um antígeno de excreção-secreção purificado do sobrenadante dum meio de cultura definido de promastigotas de *L. infantum* (LiESAp) com dipéptido muramil como adjuvante. Neste estudo entraram 348 cães, 160 integraram o grupo que recebeu a vacina e 180 os que receberam um placebo, a avaliação da vacina LiESAp na prevenção da infecção natural, baseado em testes de PCR e/ou observação do parasita em amostras de medula óssea revelou uma eficácia de 92% na prevenção da infecção (Lemesre et al., 2007).

As vacinas de antígenos recombinantes, são proteínas imunogénicas derivadas de genes clonados de Leishmania, purificadas através da passagem por vectores de expressão. A vacina baseada numa multi-subunidade recombinante duma proteína das leishmanias conhecida como Leish-111f que havia tido sucesso na prevenção da doença em modelos murinos (Coler, Goto, Bogatzki, Raman, & Reed, 2007), falhou na prevenção da infecção e não evitou a progressão da doença em cães vacinados (Grandoni et al., 2005).

10.1.3. Vacinas de 3ª geração

As vacinas de DNA contra a LCan são uma alternativa à vacinação com proteínas antigénicas, são as vacinas de 3ª geração. Um estudo de campo em dois grupos de cães, utilizou num grupo um plasmídeo que incluía o gene do antígeno LACK (DNA-LACK) e no outro grupo utilizou o DNA-LACK com um intensificador de vírus Vaccinia recombinante que continha o mesmo gene. Foi atingido um nível de protecção de 60% no segundo grupo ao fim de 17 meses de seguimento (Ramiro et al., 2003). Um segundo estudo empregou a combinação de DNA e de proteínas como agentes imunizantes, foram utilizadas na vacina as Peptidases de cisteína das leishmanias tipo I (CPB) e tipo II (CPA). Após o desafio e seguimento durante 12 meses, a presença de amastigotas na medula óssea dos 10 cães vacinados foi negativa (Miró et al., 2008). Num outro estudo, a utilização de vacinas de CPA e CPB com IL-12 recombinante como adjuvante, falhou na protecção contra a infecção em 15 cães machos da raça Beagle (Poot et al., 2006).

A administração de alopurinol na dose de 20 mg/kg pv PO SID durante uma semana todos os meses durante a época de actividade do flebotomo como medida profiláctica para a prevenção da infecção provou ser um método ineficaz, como foi concluído num estudo realizado na Grécia (Saridomichelakis et al., 2005).

10.2. Repelentes e insecticidas para a prevenção da picada do vector

O controlo dos insectos vectores pode ser uma importante medida na prevenção da LCan, embora se tenha que ter em conta que proporção da população canina se pretende tentar proteger e se o cão ou a população de cães que se pretende proteger se encontra numa região endémica ou não. O conhecimento do tipo de comportamento do flebótomo permite que sejam tomadas certas medidas por parte dos proprietários para diminuir substancialmente a hipótese de o seu cão ser infectado. Em zonas endémicas, manter o cão dentro de casa ou em local inacessível aos flebótomos, quer através de barreiras físicas (redes mosquiteiras de malha suficientemente apertada para impedir a passagem de flebótomos), quer de barreiras químicas (insecticidas repelentes) ou mesmo biológicas (certas plantas com efeito repelente: bunganvília, limonete) durante as horas de maior actividade do flebótomo são boas práticas profiláticas. Estas medidas são igualmente válidas para cães de zonas livres de leishmaniose quando estes acompanham os seus donos na deslocação a uma área endémica. Idealmente, em Portugal entre Abril e Novembro, os cães deveriam permanecer nestas zonas inacessíveis ao mosquito desde antes do início do pôr-do-sol até depois de nascer o dia, especialmente em noites que os termómetros registem mais de 15°C de temperatura (Dujardin *et al.*, 2008).

Não como alternativa, mas como uma medida tão ou mais importante que as anteriores está a aplicação de algum tipo de insecticida repelente ao cão. Um estudo realizado em dois canis numa zona endémica do sul de Itália, durante uma época inteira de transmissão da infecção pelo flebótomo, testou a solução de aplicação tópica contendo 10% de imidaclopride e 50% de permetrina em 2 grupos de cães. Cada canil contava com 3 grupos, o Grupo A, o Grupo B e um Grupo Controlo. No Grupo A a aplicação da solução *spot-on* foi efectuada com frequência mensal e no Grupo B, a frequência de aplicação do repelente foi o dobro da do Grupo A. No Grupo Controlo, os valores da incidência da taxa de infecção foram significativamente maiores quando comparados com os valores dos Grupos A e B. A eficácia de prevenção da infecção para o canil de Bari, foi de 88,9 e 100% para os grupos A e B respectivamente, para o canil de Ginosa foi de 90,36% para o grupo A e 90,73% para o grupo B, donde se concluiu que o uso desta solução tópica tipo *spot-on* é eficaz na prevenção da LCan em áreas endémicas e tem durabilidade de pelo menos 21 dias (Otranto *et al.*, 2007).

Estudos com coleiras impregnadas com deltametrina mostraram resultados com eficácias de prevenção da LCan em áreas endémicas semelhantes aos das formulações insecticidas em *spot-on*, com a vantagem de as coleiras serem eficazes na prevenção da infecção durante mais de 6 meses. Um estudo realizado no Irão, em várias áreas endémicas onde existem diversos casos declarados de LV, veio mostrar que a colocação de coleiras na população

canina provocou uma diminuição significativa na ocorrência da seroconversão tanto dos cães como das crianças que habitavam nas áreas de intervenção (Miró *et al.*, 2008). No Brasil, um país cujo território é endêmico para LCan quase na sua totalidade, onde há programas nacionais de rastreio e onde se abate anualmente uma grande percentagem dos cães infectados, foi feito um estudo epidemiológico para se tentar perceber se o uso de coleiras seria uma estratégia alternativa ao abate no controlo da LCan. A sensibilidade das análises indicou, que o impacto de qualquer das duas intervenções, não seria significativamente alterado pela variação da biologia do insecto vector, seria sim altamente influenciado pela variação das taxas de mortalidade e de seroconversão dos cães. Daqui se concluiu que a eficácia do uso de coleiras na prevenção da infecção numa dada área endémica varia com a percentagem de cães que usarem coleira nessa dada área (Reithinger *et al.*, 2004).

11. Cães errantes

Mesmo com a panóplia de alternativas que estão hoje disponíveis no mercado, tem sido difícil proteger da LCan as populações de cães que habitam em zonas endémicas. Os cães errantes (Figura 24) frequentam habitualmente ambientes peridomésticos, seja pela tentativa de obtenção de comida em acumulações de restos em zonas menos favorecidas e carenciadas em condições de higiene, seja pela presença de outro cão dentro da propriedade. Estes cães percorrem também frequentemente grandes distâncias e passam muito tempo completamente vulneráveis à picada do vector. Os cães errantes infectados são uma potencial fonte de infecção para os flébotomos e funcionam também como disseminadores da doença na medida em que podem transportar o agente para zonas livres de LCan onde o vector já se estabeleceu (Cortes *et al.*, 2007).

Os cães errantes são uma preocupação das entidades de saúde pública por causa da LCan e por outras inúmeras razões. Se nas colectividades para onde forem enviados, os cães capturados, não forem praticadas as medidas profilácticas adequados ao bloqueio da transmissão da infecção, essa medida, da detenção em canis, será até, contra-indicada uma vez que a maior densidade de canídeos de uma população, numa determinada área endémica proporcionaria ainda melhores condições para a propagação da infecção entre a população canina.

Três estudos realizados recentemente, mostraram resultados diferentes. Em todos se utilizou a IFI para detecção de anticorpos anti-leishmania, embora no estudo realizado em Madrid se tenha utilizado um limiar de positividade mais alto comparativamente com o usado em Lisboa e em Vila Franca de Xira. O estudo realizado em Lisboa e Vila Franca de Xira tiveram a duração de um ano durante o qual foram analisados 374 e 50 cães

respectivamente e o de Madrid a duração de dez anos, durante os quais se testaram os soros de 1803 cães.

Figura 24 – Cães errantes da Zona do Pinhal.



Os resultados da prevalência da infecção foram: 7,8% (141/1803) para Madrid, 21,6% (81/374) para Lisboa e 46% (23/50) para Vila Franca de Xira. Em Madrid e Vila Franca de Xira a percentagem de infectados assintomáticos foi de 79,5% (112/141) e 35,7% (8/23) respectivamente. Tanto a prevalência de infecção como a percentagem de infectados assintomáticos diferem de estudo para estudo devido à duração de cada estudo, valores de limiares de positividade distintos e utilização de diferentes técnicas de diagnóstico, mas mostram indubitavelmente que em áreas endémicas existe uma quantidade considerável de animais infectados assintomáticos (Miró *et al.*, 2007; Cortes *et al.*, 2008; Faria, 2008).

III – Leishmaniose Canina na Zona do Pinhal

1. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho é a notificação de casos de LCan existentes na Zona do Pinhal, uma área geográfica situada numa região endémica onde no entanto não existem dados publicados sobre a infecção.

O diagnóstico de LCan foi efectuado pelo Dr. Francisco Apolinário a 22 cães, integrando na totalidade dos casos, dados da história pregressa, do exame clínico e dos resultados do teste de diagnóstico serológico qualitativo baseado em técnicas imunocromatográficas - Speed® Leish, BVT Virbac. Em alguns casos foram integrados também resultados de testes de IFI, das alterações laboratoriais e da resposta ao tratamento que corroborassem o diagnóstico.

2. Material e métodos

2.1. Técnicas laboratoriais

2.1.1. Speed Leish

Speed® Leish (BVT, Virbac) é um teste rápido qualitativo que possibilita a evidenciação dos anticorpos anti-*Leishmania infantum* numa só etapa tendo por base o princípio da imunocromatografia (ou imunomigração). Para a execução do teste basta depositar uma gota da amostra (sangue total, soro ou plasma).

Logo que a amostra migra através da almofada absorvente, os anticorpos fixados às partículas coloridas ligam-se aos anticorpos anti-*Leishmania infantum* do cão.

Quando presentes na amostra, os complexos conjugado-anticorpo formados neste processo migram através da membrana dando origem ao aparecimento de uma linha de cor rosa ao nível da zona marcada com antigénios específicos anti-*Leishmania infantum* (zona do controlo positivo).

A mistura continua a sua migração sobre a membrana de suporte até atingir a zona de controlo de teste na extremidade da janela de leitura. A este nível, as partículas coloridas dão origem ao aparecimento de uma linha de cor rosa, o aparecimento da qual confirma não só a boa realização do teste e a boa qualidade dos reagentes, como valida o resultado do mesmo.

1) Composição do *Kit*:

- a. Uma célula de teste;
- b. Uma pipeta de uso único;
- c. Frasco com reagente.

2) Depósito da amostra:

- a. Com soro, plasma ou sangue total com anticoagulante: com auxílio de uma pipeta de uso único mantida na posição vertical, depositar 1 gota da amostra (40µl) no poço de amostra.
- b. Com sangue total sem anticoagulante (a desaconselhar, salvo se não houver outra possibilidade): depositar imediatamente após a recolha da amostra, 2 gotas da mesma directamente da agulha, no poço de amostra.

3) Depósito do reagente

- a. Adicionar 5 gotas de reagente no poço da amostra imediatamente após o depósito da amostra, mantendo o frasco na posição vertical,
- b. Se ao fim de 2 minutos, constatar que a migração ao nível da janela de leitura se faz muito lentamente, adicione mais 2 gotas de reagente no poço de amostra.

4) Leitura dos resultados.

- a. Efectuar a leitura do resultado após 20 minutos de migração:
- b. Um teste negativo resultará no aparecimento de uma única linha de cor rosa no lado direito da janela de leitura (zona de controlo de teste);
- c. Um teste positivo (Figura 25) resultará no aparecimento de 2 linhas bem distintas de cor rosa na janela de leitura;
- d. O não aparecimento de uma linha de cor rosa no lado direito da janela de leitura (zona de controlo de teste), é indicativo de um resultado inválido.

Figura 25 – Aspecto de um resultado positivo no *kit* de teste *Speed® Leish*.



5) Interpretação:

- a. Todo o aparecimento de uma linha de cor rosa (independentemente da intensidade da cor) no lado esquerdo da janela de leitura (zona do controlo positivo), deve ser considerado como um resultado positivo.
- b. Em algumas situações poderá aparecer uma sombra acinzentada na zona do controlo positivo. Esta sombra de interpretação difícil, nada tem a ver com uma linha bem definida, embora de cor rosa mais ou menos intensa. Este tipo de resultado deverá ser considerado como negativo.

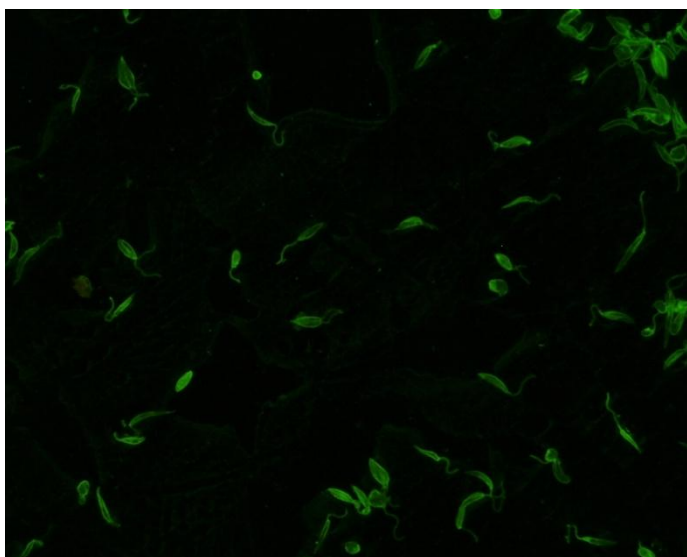
2.1.2. IFI

Foi usado como controlo positivo, soro de cão da seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (Universidade Técnica de Lisboa), previamente analisado, com títulos significativos de anticorpos anti-*Leishmania*. Como controlo negativo foi utilizado tampão fosfato-salino (PBS). Para a técnica da IFI, utilizou-se o Kit *Leishmania-Spot* IF (Laboratório bioMérieux, França, Ref. 75 931), de acordo com as seguintes indicações do fabricante:

- 1) Retirar as lâminas com antigénio do frigorífico e colocá-las à temperatura ambiente durante 15 minutos;
- 2) Preparar o PBS (BioMérieux, França, Ref. 75 511), diluindo-o em 1 litro de água destilada;
- 3) Preparar o PBS-Tween 80, através da junção de 1 mililitro de Tween 80 (Merck, Alemanha, Ref. 822 187) a 1 litro do preparado anterior;
- 4). Depositar 50 µL de PBS no poço da coluna seguinte (coluna 2);
- 5) Depositar 5 µL de soro a testar no primeiro poço da coluna 1;
- 6) Proceder de igual modo para os restantes soros a testar nos poços seguintes da coluna 1;
- 7) Com uma micropipeta contendo o volume de 50 µL:
 - a. Fazer a diluição na coluna 1;
 - b. Passar 50 µL da coluna 1 para a coluna 2;
- 8) Com a micropipeta com o volume de 10 µL, fazer a diluição e retirar a respectiva diluição dos poços 1:80 e 1:320; no último poço de cada lâmina colocar 10 µL de controlo positivo (soro de gato positivo) e seleccionar outro poço para colocar 10 µL de controlo negativo (10 µL de PBS).
- 9) Incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
- 10) Lavar as lâminas da seguinte forma:
 - a. 1.^a lavagem: rápida com PBS/Tween 80;
 - b. 2.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas num recipiente contendo PBS/Tween 80;
 - c. 3.^a lavagem: 5 minutos mergulhadas noutro recipiente contendo PBS/Tween 80;

- d. Lavar as lâminas com água destilada;
- e. Deixar secar bem as lâminas ao ar.
- 11) Depositar 10 µL do conjugado MegaScreen FLUO VET (MegaCor Diagnostik GmbH; anticorpos anti-IgG total de cão) em cada poço, incluindo no dos controlos.
- 12) Incubar durante 30 minutos a 37 °C em câmara húmida;
- 13) Lavagem igual ao passo 11.
- 14) Depois de secar muito bem as lâminas fazer a montagem definitiva colocando uma gota de glicerina tamponada (1:10) Fluoprep (BioMérieux, França, Ref. 75 521) em cada poço e cobrir com uma lamela de 50x24 mm.
- 15) Efectuar de imediato a leitura em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F), com filtro de 425 nm, ocular ×10 e objectiva ×40.

Figura 26 – Aspecto de um teste de IFI positivo – promastigotas fluorescentes



2.2. Métodos estatísticos

Para processar a informação recolhida, introduziram-se os dados na folha de cálculo do programa informático Microsoft® Excel onde foram utilizados métodos de estatística descritiva (média, moda, mediana, desvio padrão, frequência absoluta e frequência relativa) para possibilitar a apresentação dos resultados de forma sucinta e de fácil consulta.

2.3. Caracterização da Amostra

A amostra deste estudo é constituída por 22 cães que foram consultados na Clínica Veterinária SERVETCERT com localização em Cernache do Bonjardim, durante o período de estágio curricular do autor, que decorreu de 16 de Fevereiro a 25 de Maio de 2009, aos quais foi diagnosticada LCan.

2.3.1. Sexo

Dos 22 cães que constituíram a amostra, 14 (64%) eram do sexo masculino e 8 (36%) eram do sexo feminino.

2.3.2. Idade

O elemento mais velho da amostra, tinha na altura da consulta doze anos, enquanto o mais novo ainda não tinha completado um ano. A média das idades da amostra foi de $6,47 \pm 3,07$ anos e o valor da moda foi de 7 anos ($n=4$). Não foi possível precisar a idade de três dos cães da amostra, devido aos seus antecedentes errantes.

A distribuição dos cães da amostra por classes de idade (Gráfico 1) mostra que a maioria tinha idade igual ou superior a oito anos ($n=6$), cinco cães ($n=5$) tinham a idade compreendida entre os quatro e cinco anos, quatro ($n=4$) situaram-se na faixa entre os dois e os três anos, contabilizando um número de casos igual ao situado entre os seis e os sete anos ($n=4$).

Gráfico 1 – Histograma de distribuição dos cães por classes etárias.



2.3.3. Raça

A amostra era maioritariamente constituída por cães de raça indeterminada (9/22) (Tabela 1), sendo o Pastor Alemão a segunda raça mais representada (3/22). As raças nacionais foram representadas por Podengo Anão e Perdigueiro Português e constituíram uma minoria numa amostra onde a predominância foi igualmente repartida por cães de raças importadas e de raça indeterminada.

Os exemplares de Perdigueiro, o Podengo fêmea e a cadela Setter Inglês eram cães que caçavam com alguma regularidade.

Tabela 1 – Número de cães de determinada raça presentes na amostra.

Raça	Nº de cães
Indeterminada	9
Pastor Alemão	3
Perdigueiro Português	2
Podengo Anão	2
Boxer	1
Cocker Spaniel	1
Pequinois	1
Pitbull Terrier	1
Retriever do Labrador	1
Setter Inglês	1
Total	22

2.3.4. Proveniência e Habitat

Interessa definir a proveniência de cada cão da amostra porque nem todos têm origem do local onde foi efectuado estudo. Adicionalmente interessa definir o tipo de habitat onde cada cão se encontra no seu dia-a-dia, visto que estes dois factores influenciam a probabilidade de infecção.

Neste estudo foram definidos três tipos de habitat: permanência exclusivamente no exterior, permanência no interior de habitação com acesso ao exterior, denominado na Tabela 2 como misto, e permanência exclusivamente no interior de uma habitação.

Tabela 2 – Habitat e Concelho de origem dos cães da amostra

Habitat	Exterior	Misto	Interior	Total
Concelho de origem				
Sertã	10	1	3	14
Figueiró dos Vinhos	1	1	0	2
Vila de Rei	1	0	0	1
Oleiros	1	0	0	1
Proença-a-Nova	1	0	0	1
Ferreira do Zêzere	1	0	0	1
Pedrogão Grande	0	1	0	1
Penamacor	1	0	0	1
Total	16	3	3	22

Interessa referir que Figueiró dos Vinhos, Ferreira do Zêzere e Pedrogão Grande não pertencem à Zona do Pinhal embora sejam concelhos limítrofes do Concelho da Sertã.

3. Resultados

3.1. Sinais clínicos e serologia

Os dados recolhidos do estímulo iatrotrópico, história pregressa, e exame físico manifestados por cada cão, foram inseridos na Tabela 3 e denominados Sinais Clínicos. O número de cada cão corresponde sempre ao mesmo elemento da amostra nesta tabela e em todas as que se seguem.

Tabela 3 – Sinais clínicos manifestados por cada cão e respectivo resultado dos testes serológicos *Speed® Leish* e IFI

Cão n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Sinais Clínicos																						
Linfadenopatia	√			√	√		√	√					√	√		√		√	√	√	√	√
Letargia	√			√		√		√	√		√	√	√				√		√	√	√	
Anorexia	√			√		√	√				√	√								√	√	
Alopécia								√				√		√			√	√	√			
Úlceras cutâneas					√			√						√		√		√	√			
Caquexia			√	√	√				√								√					√
Perda de peso				√	√		√		√								√				√	√
Onicogrifose									√			√	√			√	√		√			
Seborreia seca				√	√								√				√		√			
Claudicação					√				√				√	√								√
Mucosas pálidas	√						√					√	√								√	
Vómito						√					√	√									√	
Melena						√					√	√										
Úlceras orais												√						√				√
Conjuntivite																		√	√			
Dermatite nodular										√				√								
Hiperqueratose										√									√			
Desidratação						√					√											
Halitose urémica												√									√	
Epistáxis		√																				
Polifagia									√													
Diarreia												√										
Opacidade corneal										√												
Convulsões							√															
Fasciculações												√										
Cegueira		√																				
Teste Speed®Leish	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.e	+	+	+
Teste IFI 1:320	n.e	n.e	n.e	n.e	+	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	n.e	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+

Legenda: (√) – manifestou; (+) – positivo; (-) – negativo; (n.e) – não efectuado.

Os resultados de ambos os testes realizados para a pesquisa de anticorpos anti-leishmania são também parte integrante da Tabela 3, possibilitando assim a comparação dos resultados em ambos os testes para cada cão, a par dos sinais clínicos apresentados.

Os sinais clínicos compatíveis com LCan e o resultado positivo no teste *Speed® Leish* foram os elementos chave para a integração no estudo de 21 dos cães que constituem a amostra, excepto para o cão número 19 ao qual apenas foi efectuado o teste de IFI.

Os resultados negativos ao teste de IFI observados em alguns casos levantam questões que são discutidas adiante.

O sinal clínico mais prevalente na amostra estudada, constituída por 22 cães foi a linfadenopatia, que se manifestou em doze cães (59,1%) (Tabela 4). O aumento generalizado do tamanho dos linfonodos verificou-se em onze cães e em dois, apenas se verificou o aumento do tamanho dos linfonodos poplíteos.

Tabela 4 – Número e percentagem de cães que manifestaram um dado sinal clínico.

Sinal clínico	Nº de cães	Percentagem de cães
Linfadenopatia	13	59,1%
Letargia	12	54,5%
Anorexia	8	36,4%
Perda de peso	7	31,8%
Alopécia	7	31,8%
Úlceras cutâneas	6	27,3%
Caquécia	6	27,3%
Onicogrifose	6	27,3%
Mucosas pálidas	6	27,3%
Claudicação	5	22,7%
Seborreia	5	22,7%
Vómito	4	18,2%
Melena	3	13,6%
Úlceras orais	3	13,6%
Conjuntivite	2	9,1%
Dermatite nodular	2	9,1%
Hiperqueratose	2	9,1%
Desidratação	2	9,1%
Halitose urémica	2	9,1%
Diarreia	1	4,5%
Polifagia	1	4,5%
Opacidade corneal	1	4,5%
Epistáxis	1	4,5%
Convulsões	1	4,5%
Fasciculações	1	4,5%
Cegueira	1	4,5%

A letargia manifestou-se em doze cães (54,5%) e a anorexia em oito casos (36,4%), seguindo-se por ordem decrescente de frequência a perda de peso em sete cães (31,8%), as manifestações cutâneas como a alopecia igualmente em sete (31,8%). As úlceras dérmicas observaram-se em seis cães (27,3%) a par da caquécia e das mucosas pálidas.

A onicogrifose foi outro sinal clínico que se manifestou em 6 cães da amostra, (27,3%) sendo mais evidente nuns casos que noutros.

A seborreia seca foi observada em cinco casos (22,7%), assim como a claudicação. Outras manifestações cutâneas como a hiperqueratose nasal e presença de nódulos observaram-se em apenas dois dos cães da amostra (9,8%).

Quatro dos cães (18,2%) tinham história de vômito. Tanto a melena como as úlceras orais foram sinais clínicos que se manifestaram em três casos (13,6%).

As manifestações oculares observadas foram a conjuntivite, em dois cães (9,8%), a opacidade corneal em um caso (4,5%) e cegueira devido a glaucoma secundário a uveíte também num caso.

Foi detectada clinicamente desidratação em dois cães (9,8%) assim como halitose urémica igualmente em dois casos (9,8%), enquanto a epistáxis foi um dos sinais clínicos que apenas se observou em um dos casos (4,5%), com a mesma prevalência observaram-se ainda diarreia, polifagia, fasciculações e crises convulsivas.

3.2. Alterações laboratoriais

No seguimento da avaliação clínica dos pacientes caninos foram efectuadas uma série de exames complementares de diagnóstico com intuito de avaliar a função renal, hepática e hematológica. Em alguns casos, as alterações bioquímicas e hematológicas auxiliam no diagnóstico de LCan. Infelizmente, por motivos de contenção económica, que podem dever-se a factores sócio-económicos desfavoráveis dos donos ou à própria conjuntura económica actual, nem sempre foram efectuadas as análises laboratoriais necessárias para a correcta abordagem de casos de LCan.

3.2.1. Alterações bioquímicas

Sendo a IRC a principal e mais dramática complicação da LCan, justifica-se a medição dos valores de BUN e Creatinina em todos os cães infectados. Como já foi referido, tal não foi possível, mas de todos os parâmetros bioquímicos, foram estes os que foram avaliados numa parte mais significativa da amostra. E de facto, nos quinze cães nos quais foram avaliados estes parâmetros, observaram-se valores de BUN acima dos valores de referência em nove cães e de Creatinina em oito (Tabela 5).

Dos restantes parâmetros bioquímicos avaliados é ainda importante salientar o aumento da concentração de Globulinas séricas em quatro cães e das Proteínas totais (PT) em dois cães, o aumento do ião Fosfato em quatro dos cães que também revelaram aumento dos valores de BUN e Creatinina, tendo também um destes exemplares revelado níveis baixos do ião Cálcio.

Tabela 5 – Perfil bioquímico dos cães da amostra

Cão n.º	PT (g/dl)	Albumina (g/dl)	Globulinas (g/dl)	ALT (UI/L)	FAZ (UI/L)	BUN (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Cálcio (mg/dl)	Fosfato (mg/dl)
1						130 ↑	2,6 ↑		
3						130 ↑	8 ↑		
4			4,4						
5						51 ↑	3 ↑		
7				229 ↑		130 ↑	7,8 ↑	6,5 ↓	16,1 ↑
8	7,9	3,3	4,6 ↑			35 ↑	0,7		
9	9,7 ↑	3,9	5,8 ↑			15	0,7		
11				44	39	130 ↑	13,6 ↑		10,8 ↑
12						130 ↑	12 ↑		
13	8,5 ↑	3,4	5,1 ↑			17	1,1		
14						13	0,8		
16						12	1,1		
17						130 ↑	7,3 ↑		16,1 ↑
18	7,4	2,8	4,7 ↑			11	1,2		
21	6,7	2,9	3,8			130 ↑	8 ↑		16,1 ↑
22	7,1	3	4,1			18	1,1		

Legenda: (↑) – acima do valor de referência; (↓) – abaixo do valor de referência. Valores de referência: PT – 5,2-8,2; Albumina – 2,3-4,0; Globulinas – 2,5-4,5; ALT – 10-100; FAS – 23-212; BUN – 7-27; Creatinina – 0,5-1,8; Cálcio – 7,9-12; Fosfato – 2,5-6,8.

O nível sérico da enzima hepática ALT foi avaliado em dois casos, dos quais apenas um revelou aumento acima dos valores de referência.

3.2.2. Alterações hematológicas

As alterações hematológicas mais significativas na amostra foram a diminuição do número de Plaquetas, verificada em cinco casos e a diminuição dos valores do hematócrito a par da diminuição dos valores de hemoglobina em quatro cães (Tabela 5).

Verificou-se ainda leucocitose em três cães e granulocitose também em três cães, eosinofilia igualmente em três casos e neutrofilia em dois cães.

Tabela 6 – Perfil hematológico dos cães da amostra.

Cão n.º	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dl)	CHCM (g/dl)	Leucócitos ($\times 10^9/L$)	Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	Granulócitos ($\times 10^9/L$)	Eosinófilos ($\times 10^9/L$)	Plaquetas ($\times 10^9/L$)
1	15,2 ↓	5,3 ↓	34,9	19,5 ↑		13,8 ↑		60 ↓
3	44	15					1,8 ↑	
4	38,1							58 ↓
7	12,1 ↓	4,4 ↓	36,4	8,7		7,3		231
8	49,2	15,7	31,9	21,3 ↑	17,5 ↑	18,1 ↑	0,6	233
11	56,9 ↑	17,7	31,1	17,2 ↑		13,2 ↑		
13	28,5 ↓	9,4 ↓	33	15,6		11,1		23 ↓
15	47,6	12,8		7,6		4,9		51 ↓
16	48,8	16,5	33,8	10,2	6,5	7,5	1	278
20	48,7	15,9	32,6	16,8	10,6 ↑	13,2 ↑	2,6 ↑	377
21	14,9 ↓	5,4 ↓	36,2	9	6,7	7,5	0,8	259
22	45,2	14,5	32,1	9	5,5	7	1,7 ↑	152 ↓

Legenda: (↑) – acima do valor de referência; (↓) – abaixo do valor de referência. Valores de referência: Hematócrito – 37-55; Hemoglobina – 12-18; CHCM – 30-36,9; Leucócitos – 6-16,9; Granulócitos – 3,3-12; Neutrófilos – 2,8-10,5; Eosinófilos – 0,5-1,5; Plaquetas – 175-500

3.3. Dados adicionais

3.3.1. Protecção repelente e insecticida

Nenhum dos animais que constituem a amostra do estudo utilizava até à altura do diagnóstico, qualquer tipo de repelente ou insecticida com comprovada acção protectora contra a actividade flebotomínea.

3.3.2. Tratamento, seguimento e afecções concomitantes

Aos cães que integraram a amostra foi administrado o tratamento com Alopurinol ou com Antimoniato de Meglumine e Alopurinol, consoante os valores de BUN e Creatinina se apresentassem elevados ou dentro dos valores de referência respectivamente.

A pauta terapêutica implicou a realização de no mínimo dez sessões de antimoniato de meglumine na dose de 100 mg/kg p.v. em dias alternados ou de 3 em 3 dias via S.C. e de alopurinol na dose de 20 mg/kg p.v. SID *per os* ininterruptamente.

Alguns casos de LCan que o autor teve a oportunidade de observar haviam previamente sido diagnosticados pelo Dr. Francisco Apolinário. Os cães número 2, 6, 7, 11 e 21 foram consultados durante o período de estágio devido a recaída da condição clínica, posteriormente ao período em que o tratamento havia alcançado a cura sintomática.

Aos cães número 1, 3, 8, 10 e 18 foram diagnosticadas outras afecções concomitantemente com LCan. O cão número 15 não apresentava sinais clínicos compatíveis com LCan, pois

encontrava-se em tratamento há um período superior a três anos e o estímulo iatrogénico foi uma situação aguda derivada da mordedura de um ofídio.

4. Discussão

A percentagem de machos (64%) que constituiu a amostra neste trabalho foi bastante superior à percentagem de fêmeas (36%), dados concordantes com o trabalho de outros autores (Miranda *et al.*, 2008), outros autores consideram que o sexo não é um factor preponderante para o desenvolvimento de LCan (Ciaramella & Corona, 2003a).

A maior prevalência na amostra de cães com idade igual ou superior a oito anos e o valor da moda ser de sete anos, são dados que estão de acordo com o facto de a idade ser, por um lado um factor que aumenta a probabilidade de uma cão se infectar por se expor sucessivamente a cada ano, a um novo ciclo de transmissão de LCan (Miró *et al.*, 2007; Oliva *et al.*, 2006). Por outro lado, também está de acordo com o facto de a LCan ser uma doença cujo período de incubação, varia muito consoante o estado imunitário do animal infectado, podendo tardar sete anos até que haja manifestação sintomática da doença (Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005). Por estas razões e talvez pelo facto de os animais jovens permanecerem mais tempo dentro de casa, onde estão mais resguardados dos flebotomos, não é comum o diagnóstico de LCan antes de um ano de idade, embora se verifique (Santos *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2008; Pinhão, 2009).

A raças presentes na amostra são o reflexo das preferências dos proprietários dos cães aos quais foi diagnosticada LCan e com os quais o autor teve contacto. Pode haver alguma disparidade de resultados em relação às raças presentes neste estudo e noutros estudos de diferentes autores (Miranda *et al.*, 2008; Marques M. I., 2008; Pinhão, 2009) influenciada por inúmeros factores, sendo concerteza o número limitado de exemplares que constituem a amostra deste estudo, um dos mais importantes. No entanto, há resultados interessantes como a presença dum exemplar da raça Boxer, raça cuja grande parte dos exemplares têm predisposição genética para desenvolvimento de sinais clínicos precocemente (Baneth *et al.*, 2008).

A amostra incluiu quatro cães de caça, o que segundo alguns autores é um factor de risco para a infecção com *L. infantum* em zonas onde a LCan é endémica e especialmente se estes não utilizarem qualquer tipo de protecção contra actividade flebotomínea durante esta actividade, como é o exemplo destes casos (Leontides *et al.*, 2002), embora haja autores que questionam a possibilidade de os ciclos de transmissão silvestre e doméstico da LCan se influenciarem (Sobrinho *et al.*, 2008).

Da amostra fizeram também parte quatro cães de duas raças autóctones, Podengo Anão e Perdigueiro Português. O Podengo Ibicenco, raça autóctone das Ilhas Baleares, onde a LCan é endémica, apresenta uma resposta imunitária predominantemente celular que lhe

permite manter um *status* de infectado assintomático (Gallego *et al.*, 2000), o que parece não se verificar noutras raças autóctones de zonas endémicas como o Podengo Anão ou o Perdigueiro Português, outros autores defendem que a raça não é um factor importante para o desenvolvimento de LCan (Ciaramella & Corona, 2003a).

A proveniência dos cães justifica a infecção baseada em informação da bibliografia apenas em dois dos casos apresentados, o do cão número 16, que vivia no Concelho de Penamacor, região vizinha do Concelho do Sabugal donde existem dados da infecção em raposas (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003), apoiado ainda pelo facto de este ser uma cão de caça. E o caso do cão número 11 que efectuava várias viagens à zona da Covilhã, região de onde existem dados de 2005 de que a seroprevalência da infecção na população canina da região atinge 12,5% (Campino *et al.*, 2008). Os restantes cães da amostra são provenientes da Zona do Pinhal e a hipótese de se terem deslocado a regiões onde existem dados da prevalência da infecção é remota.

Esta informação e o elevado número de casos de LCan apresentados neste trabalho sustentam a existência de um ciclo de transmissão activo de LCan na Zona do Pinhal.

Em comparação ao número de cães que viviam permanentemente no exterior (16/22) ou que a ele tinham livre acesso (habitat misto – 3/22), os animais que passavam a maior parte do tempo dentro de casa (3/22) constituíram uma minoria na amostra, dados a partir dos quais se pode inferir que a permanência em locais inacessíveis ao vector pode ser um factor limitante mas não impeditivo para que um cão seja infectado com *L. infantum*.

As percentagens obtidas neste estudo para os sinais clínicos mais frequentemente exibidos pelos exemplares da amostra estão na sua maioria de acordo com os valores obtidos por outros autores. Os valores obtidos neste estudo para linfadenopatia, letargia, perda de peso, alopecia, dermatite ulcerativa, caquexia, onicogribose, mucosas pálidas, claudicação, conjuntivite, dermatite nodular, diarreia e epistaxis encontram-se dentro dos intervalos referenciados por outros autores para casos de LCan (Baneth *et al.*, 2008; Blavier *et al.*, 2001; Pinhão, 2009; Brito *et al.*, 2006; Marques M. I., 2008).

O valor obtido para a anorexia neste estudo é ligeiramente superior ao valor máximo obtido na bibliografia e os valores da seborreia seca e hiperqueratose são ligeiramente inferiores (Blavier *et al.*, 2001; Pinhão, 2009).

Os valores percentuais dos sinais clínicos como o vômito, úlceras orais, desidratação, halitose urémica, convulsões e fasciculações, por serem consequência de IRC, uma situação decorrente da LCan, não são referidos pelos vários autores citados. A par destes também não são referidos na revisão bibliográfica valores relativos aos sinais clínicos de melena, polifagia, opacidade corneal e cegueira, por serem sinais inespecíficos e por vezes raros (Blavier *et al.*, 2001; Sauquillo, 2005).

O cão número 1, uma fêmea adulta com 4Kg, de raça e idade indeterminada, tinha um historial errante.

Passado cerca de um mês da sua adopção, por uma família do Concelho da Sertã, começou com história de letargia, anorexia e perda de peso.

O exame físico revelou alopecia generalizada, inflamação da articulação femoro-tíbio-patelar esquerda, com envolvimento do linfonodo poplíteo que se encontrava aumentado, temperatura de 40,2 °C, queixas à palpação do abdómen cranial e mucosas pálidas. Segundo vários autores, os sinais clínicos exibidos, observam-se com frequência em casos de LCan (Baneth et al., 2008; Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005; Marques M. I., 2008), excepto a pirexia que só mais raramente se observa em casos de evolução aguda (Blavier et al., 2001; Pinhão, 2009).

Foram realizados testes para a detecção de anticorpos anti-*leishmania* e anti-*ehrlichia* com os kits *speed® leish* e *speed® ehrli* e ambos deram resultados positivos. Segundo alguns autores, as desvantagens deste tipo de teste são: ser qualitativo, a baixa sensibilidade em infecções assintomáticas e o fraco valor preditivo negativo (Miró et al., 2008).

As alterações laboratoriais evidenciadas neste caso como a anemia, a trombocitopénia, o aumento dos níveis séricos de BUN e de Creatinina, são frequentes nos casos de LCan (Amusategui et al., 2003; Reis et al., 2006; Terrazzano et al., 2006; Font, 2000), assim como o são nos de erliquiose canina (Baneth, 2009b).

A leucocitose e a granulocitose não são as alterações mais frequentes em casos de LCan, há mais casuística de leucopénia ou eosinofilia, embora existam casos descritos dos primeiros (Amusategui et al., 2003; Garcia et al., 2008).

Estas alterações não são frequentes nos quadros de nenhuma de ambas as doenças, podemos então estar perante um caso de infecção concomitante com *Leishmania infantum* e *Ehrlichia canis*, em que as interações entre os dois agentes patogénicos e o sistema-imunitário provocaram respostas que não são frequentes quando os agentes patogénicos causam infecção isoladamente (Baneth, 2009c).

O cão número 2, um macho de 32,3 kg da raça Cocker Spaniel com doze anos, tinha LCan que lhe havia sido diagnosticada aos dois anos de idade. Este cão passava a totalidade do tempo dentro de casa e pertencia a uma família que habitava no Concelho da Sertã.

O estímulo iatrogénico que nessa altura o levou à consulta consistia numa seborreia seca abundante e úlceras cutâneas generalizadas, sinais clínicos descritos por vários autores em casos de LCan (Baneth et al., 2008; Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005; Faria, 2008). Após o diagnóstico realizado com a história pregressa, sinais clínicos e realização do teste *Speed® Leish*, foi efectuado tratamento com alopurinol e antimonio de meglumine, o que permitiu a regressão completa dos sinais clínicos. Posteriormente, o cão sofreu repetidas

recaídas da sua condição clínica, que se manifestaram em períodos em que o cão não estava em tratamento ou em que o tratamento era efectuado apenas com alopurinol, situação relatada frequentemente em seguimentos de casos de LCan (Miró *et al.*, 2008; Ciaramella & Corona, 2003b; Pasa *et al.*, 2005; Saridomichelakis, *et al.*, 2005).

Um glaucoma secundário provocado por uma uveíte bilateral cegou completamente este cão (Brito *et al.*, 2006; Miró, 2005; Roze, 2005) e durante a realização deste estudo foram vários episódios de epistaxis bilateral que se sucediam com frequência semanal, o estímulo iatrotrópico deste caso (Baneth, 2009e).

Apesar do excesso de peso, do sopro cardíaco bilateral de grau III em VI, do grande aumento do tamanho do testículo esquerdo e dos episódios hemorrágicos, este era um animal com uma vivacidade notável, no entanto, o desespero dos donos face aos episódios hemorrágicos resultou no pedido de eutanásia do animal.

O cão número 3, uma fêmea de 27,5 kg da raça Pastor Alemão com 10 anos de idade, guarda de uma habitação no Concelho de Oleiros, tinha LCan que lhe havia sido diagnosticada havia cerca de 3 anos. À data da consulta era efectuado tratamento com alopurinol e o único sinal compatível com LCan era a marcada caquécia (Baneth *et al.*, 2008; Blavier *et al.*, 2001; Pinhão, 2009).

Esta cadela foi levada à clínica para fazer análises de rotina e porque abanava muito a cabeça e exibia um prurido auricular intenso. O exame com otoscópio revelou um cerúmen negro com odor acre e inflamação do canal auditivo.

As análises laboratoriais revelaram valores de BUN e Creatinina elevados que podem representar uma IRC decorrente da LCan (Costa, *et al.*, 2003) e eosinofilia. A eosinofilia nem sempre se manifesta em animais com LCan, é descrita sobretudo em casos com sintomatologia cutânea, e explica-se por uma reacção alérgica à presença do parasita em tecidos com grande quantidade de mastócitos como é a pele (Garcia *et al.*, 2008; Amusategui *et al.*, 2003). A presença crónica do parasita neste tipo de tecidos (pele, pulmão) provoca a desgranulação dos mastócitos, o que resulta na recruta de mais eosinófilos da medula óssea para a circulação.

A otite, da qual a origem não foi apurada, embora tenha respondido ao tratamento com antibiótico local, pode ser o resultado da diminuição das defesas da pele, provocada pela presença das leishmanias neste órgão (Baneth, 2009c).

O cão número 4, um macho de três anos com 40 kg e raça indeterminada, guarda duma propriedade agrícola no Concelho de Ferreira do Zêzere, foi levado à consulta com história de letargia, anorexia, perda de peso, falta de força e queixas dos membros posteriores mas sem claudicação, que persistia havia uma semana. O exame físico revelou seborreia seca, linfonodos poplíteos aumentados de tamanho, letargia e caquécia, sinais que encaixam num quadro de LCan (Baneth et al., 2008; Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005).

Foi efectuado realizado o teste *Speed® leish* para a detecção de anticorpos anti-*leishmania*, o qual deu um resultado positivo (Miró et al., 2008) e os exames laboratoriais revelaram um valor de hematócrito dentro do intervalo de referência, embora muito perto do limite mínimo, trombocitopenia e hiperglobulinemia, alterações referenciadas em muitos casos de LCan (Amusategui et al., 2003; Font, 2000; Reis et al., 2006; Terrazzano et al., 2006).

O cão número 5, um macho com 21 kg, dez meses de idade e raça indeterminada, foi levado à consulta por causa da perda de peso progressiva, das lesões crostosas indolentes, da claudicação e queixas articulares que persistiam havia cerca de um mês. Este era um cão de guarda de uma habitação do Concelho da Sertã. O exame físico revelou seborreia seca, úlceras cutâneas e crostas, caquexia e linfonodos poplíteos aumentados de tamanho, sinais compatíveis com um quadro de LCan (Roze, 2005; Miró, 2005; Blavier et al., 2001; Faria, 2008)

Foi efectuado realizado o teste *Speed® leish* para a detecção de anticorpos anti-*leishmania*, o qual deu um resultado positivo (Miró et al., 2008). À mesma amostra de sangue foi realizado o teste de IFI que também deu um resultado positivo (Gomes et al., 2008). Estes dados, juntamente com o aumento dos valores de BUN e Creatinina (Costa et al., 2003), não deixam dúvida acerca da acurácia do diagnóstico de LCan efectuado a este animal. O tratamento com antimoniato e alopurinol proporcionaram francas melhoras na condição clínica deste animal durante o período em que efectuou o tratamento (o tratamento com alopurinol foi prolongado por pouco mais de um mês), após a supressão da medicação verificou-se uma recaída da condição clínica (Garcia et al., 2007; Miró et al., 2008; Pasa et al., 2005).

O cão número 6, uma fêmea com 26 kg, onze anos de idade, da raça Pastor Alemão, era guarda de uma habitação rural no concelho da Sertã, tinha LCan complicada com IRC que lhe havia sido diagnosticada havia cinco anos (Amusategui *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006).

Nessa altura efectuou-se o tratamento com alopurinol para a LCan e a terapêutica dietética para patologia renal com baixo índice de proteína, proteína de alto valor biológico e baixo índice de fósforo, até que os níveis séricos de BUN e Creatinina atingiram valores fisiológicos (Ciaramella & Corona, 2003b; Garcia, *et al.*, 2007). Após este período, o antimoniato de meglumine foi adicionado à terapêutica durante um período de 20 dias. Perante as melhoras alcançadas, a administração de alopurinol foi suspensa por opção dos donos, os quais também decidiram parar a terapêutica dietética.

Esta cadela reapareceu na consulta acompanhada de história de letargia, anorexia e vômitos. Segundo os donos, a quantidade de urina emitida diariamente era normal, embora a ingestão de água estivesse diminuída. O exame físico revelou uma desidratação grave com persistência da prega cutânea e taquicardia e respiração abdominal (Costa *et al.*, 2003).

Foi efectuada infusão contínua com NaCl 0,9%, um antiácido, um anti-emético, Bicarbonato de Sódio e antibiótico. Durante a administração da terapêutica a frequência cardíaca diminuiu, a respiração tornou-se mais costal e pôde ser observada a deposição de fezes de cor muito escura – melena.

Esta cadela voltou a ser levada à clínica dois dias depois, já num estado moribundo para ser abatida.

O cão número 7, um macho de 33,6 kg da raça Retriever do Labrador com sete anos de idade, que passava os dias entre a habitação e o jardim numa propriedade no Concelho de Pedrógão Grande, tinha LCan que lhe havia sido diagnosticada dois anos antes, situação para a qual efectuava tratamento com alopurinol.

Cerca de um mês antes da ida à consulta começou com contracções do tipo convulsivo com concomitante emagrecimento progressivo desde a mesma altura. Os donos visitaram outro Médico Veterinário por causa desta situação, o qual prescreveu um derivado fenotiazínico para tentar controlar a suposta epilepsia, com o qual não obteve quaisquer resultados. Os acessos tornaram-se mais frequentes e cerca de uma semana antes da ida à consulta o animal desenvolveu anorexia total.

O exame físico revelou perda de peso, mucosas pálidas e linfonodos poplíteos aumentados de tamanho.

As análises laboratoriais revelaram aumento dos valores séricos de BUN, de Creatinina, da actividade da enzima hepática ALT e hiperfosfatémia e diminuição dos valores séricos de Cálcio e anemia.

Este cão apresentou sinais clínicos e alterações laboratoriais que são frequentes em casos de LCan (Amusategui *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Marques M. I., 2008), além da pesquisa de anticorpos anti-leishmania com o *kit Speed® Leish* ter dado resultado positivo. Os episódios convulsivantes podem ser resultado de uma encefalopatia urémica, consequência da IRC.

O cão número 8, um macho de 33 kg da raça Pitbull Terrier e cinco anos de idade era guarda num estabelecimento comercial no Concelho de Figueiró dos Vinhos.

Foi levado à consulta devido ao prurido generalizado resultante do confronto com um cão errante. Este prurido foi posteriormente transmitido ao outro cão existente no estabelecimento, adicionalmente os donos informaram que o cão passava cada vez mais tempo a dormir.

O exame físico revelou lesões de dermatite auto-inflingida no pavilhão auricular e zona periocular e concomitante otite e conjuntivite bilateral. Dermatite inter-digital das quatro extremidades, placas alopécicas na região lateral das articulações fémoro-tíbio-patelar e tarso-metatarsica de ambos os membros com hemorragia da placa localizada no membro posterior direito. Linfonodos poplíteos aumentados. Este quadro atípico (Blavier *et al.*, 2001) não impediu no entanto que fosse efectuada a pesquisa de anticorpos anti-*leishmania* com o teste *Speed® Leish*, o qual deu um resultado positivo (Miró *et al.*, 2008).

As análises laboratoriais revelaram aumento dos valores séricos de BUN (Costa *et al.*, 2003) e hiperglobulinémia (Pereira Fonseca & Villa de Brito 2009), alterações frequentes em casos de LCan e leucocitose que pode estar relacionada com a infecção cutânea concomitante que este cão apresentava (Baneth, 2009c)

A imunossupressão causada pela LCan pode ter proporcionado a invasão da pele por outros microrganismos (Mozos *et al.*, 1999) e a instalação duma micose cutânea. Embora os resultados não sejam conclusivos, o tratamento efectuado com base neste diagnóstico associado ao tratamento da LCan proporcionou a cura clínica do animal (Garcia *et al.*, 2007).

O cão número 9, um macho com 18,9 kg, de raça indeterminada e dois anos de idade, vivia no exterior duma habitação no Concelho de Proença-a-Nova e foi levado à consulta por causa de uma história de polifagia com perda de peso e fraqueza.

O exame físico revelou caquécia, onicogribose, letargia e dor nas articulações durante o exame músculo-esquelético.

O resultado da pesquisa de anticorpos anti-*leishmania* com o *kit Speed® Leish* foi positivo (Miró *et al.*, 2008), o que a par da sintomatologia compatível (Ciaramella & Corona, 2003a; Santos *et al.*, 2006), corrobora o diagnóstico de LCan.

As alterações laboratoriais revelaram hiperproteinémia com hiperglobulinémia, duas situações também descritas em casos de LCan (Font, 2000; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2009).

O cão número 10, uma fêmea com 33,3 kg, da raça Boxer, com nove anos de idade, passava o tempo entre o espaço interior e exterior de uma habitação no Concelho da Sertã. Foi levada à consulta por causa de uma piómetra que não cedia ao tratamento.

O exame físico pôs em evidência uma hiperqueratose exuberante da trufa, um granuloma palpebral e opacidade corneal.

As análises laboratoriais revelaram apenas o aumento acima do intervalo referência do valor das globulinas séricas, que segundo alguns autores (Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009) é a alteração laboratorial mais comum nos casos de LCan.

A hiperglobulinémia, os sinais clínicos (Pinhão, 2009; Roze, 2005), a história pregressa (Baneth, 2009c) e até a especial predisposição da raça (Baneth *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2000) deste cão, motivaram a realização da pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* com o *kit Speed® Leish*, o qual deu um resultado positivo.

Depois de instaurado o tratamento para a LCan, associado ao tratamento para a endometrite, observou-se a resolução da endometrite.

O cão número 11, um macho com 45,5 kg da raça Pastor Alemão, com nove anos de idade, era o guarda do espaço exterior de uma habitação no Concelho da Sertã e acompanhava frequentemente o dono em viagens à Covilhã, região onde segundo dados do Observatório Nacional das Leishmanioses de 2005, a seroprevalência de LCan atingia valores de 12,5% (Campino *et al.*, 2008).

Foi-lhe diagnosticada LCan três anos antes e era efectuado tratamento com alopurinol, quando foi levado à clínica por causa de uma história de letargia e anorexia com duração de três dias e vômitos e diarreia de dois dias.

O exame físico revelou letargia, dispneia com respiração abdominal e desidratação.

As análises laboratoriais revelaram aumento do valor hematócrito, dos valores séricos de BUN e Creatinina, leucocitose, granulocitose e hiperfosfatémia.

Depois de instaurado o tratamento de urgência este animal teve leves melhorias da sua condição vindo a falecer 2 dias depois.

Os sinais patentes neste caso, assim como as alterações laboratoriais são típicos de uma IRC descompensada, decorrente de uma recaída do quadro de LCan (Amusategui *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2003; Moraitou *et al.*, 2007).

O cão número 12, um macho com 5,4 kg, da raça Podengo Anão, com sete anos de idade era a mascote de uma habitação no Concelho da Sertã onde passava a maior parte do tempo. Este cão foi levado à consulta por causa de uma história de anorexia, vômitos e melena. Cerca de seis meses antes da data da consulta teve diarreia de intestino grosso, que cessou após tratamento com metronidazol. Posteriormente houve uma recidiva da diarreia que cessou novamente após tratamento, situação descrita em alguns casos de LCan (Moraitou *et al.*, 2007)

O exame físico revelou letargia, alopecia do plano nasal e ponta da cauda e onicogribose, sinais compatíveis com LCan (Baneth *et al.*, 2008; Roze, 2005) e fasciculações musculares. À exploração bucal puderam detectar-se mucosas pálidas, halitose urémica, sinais de periodontite avançada e úlceras labiais. Os dados recolhidos da exploração bucal podem ser decorrentes duma situação urémica derivada da IRC provocada pela LCan, assim como as fasciculações (Costa *et al.*, 2003).

A pesquisa de anticorpos anti-*leishmania* com o *kit Speed® leish* deu resultado positivo (Miró *et al.*, 2008) e as análises laboratoriais mostraram aumento dos valores séricos de BUN e Creatinina, situações que suportam o diagnóstico de LCan (Reis *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007).

O cão número 13, um macho com 6,4 kg, da raça Pequinois, com sete anos de idade era a mascote de uma habitação no Concelho da Sertã, local onde passava a maior parte do tempo.

Foi levado à consulta com história de letargia e dificuldade em certos movimentos que anteriormente efectuava com facilidade, como o saltar de cima da cama ou do sofá para o chão (Santos *et al.*, 2006).

O exame físico revelou membranas mucosas pálidas, linfonodos poplíteos aumentados de tamanho, onicogribose e seborreia seca, sinais todos descritos por vários autores em casos de LCan (Ciaramella & Corona, 2003a; Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009).

Efectuou-se a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* com o *kit* de teste *Speed® leish* para o qual se obteve um resultado positivo, embora a realização do teste serológico quantitativo de IFI à mesma amostra de sangue tenha revelado um resultado negativo. O resultado

negativo no teste de IFI pode ser resultado dum erro técnico laboratorial provocado pelo autor, pelo que este resultado não invalida o diagnóstico de LCan.

As análises laboratoriais revelaram hiperproteinémia com hiperglobulinémia, diminuição dos valores de Hematócrito e Hemoglobina e trombocitopénia, todas, alterações descritas frequentemente em casos de LCan (Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009; Reis, *et al.*, 2006; Font, 2000; Cortese *et al.*, 2008) e um número de granulócitos circulantes muito próximo ao valor de referência máximo.

O cão número 14 era uma fêmea com 25 kg da raça Setter Inglês com sete anos de idade que permanecia num canil numa habitação no Concelho da Sertã.

Neste caso, o único estímulo iatrotrópico foi uma claudicação do membro pélvico esquerdo de causa desconhecida, com duração de três dias (Santos *et al.*, 2006; Giménez & Menéndez, 2005; Souza *et al.*, 2005).

Durante a realização do exame físico o animal manifestou dor durante a avaliação do sistema músculo-esquelético, sem revelar no entanto sinais de crepitação articular ou fractura. Pode observa-se também um granuloma no plano nasal, uma pequena úlcera com bordos alopecicos localizada na face lateral da articulação úmero-radio-ulnar esquerda e linfonos poplíteos aumentados de tamanho (Amusatogui *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2008).

Efectuou-se a pesquisa de anticorpos anti-*leishmania* com os testes Speed® Leish e IFI e ambos revelaram resultados positivos (Gomes *et al.*, 2008).

Foram ainda avaliados os valores séricos de BUN e Creatinina que revelaram estar dentro do intervalo de referência.

A administração de antimoníaco de meglumine e alopurinol resolveu os sinais de claudicação depois de quatro dias de tratamento (Pasa *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006).

O cão número 15, uma fêmea com 30 kg da raça Perdigueiro Português com quatro anos de idade era guarda numa casa agrícola no Concelho da Sertã, passava a maior parte do tempo ao ar livre, o que pode ter proporcionado o sucedido de ter sido mordida por um ofídio.

Esta cadela chegou à consulta com um quadro de edema agudo que em nada se relaciona com a LCan. No entanto esta cadela tinha LCan que lhe havia sido diagnosticada 2 anos antes e para a qual era efectuado tratamento com alopurinol. À data da consulta não foram detectados sinais clínicos que se possam atribuir à fisiopatologia da LCan, mesmo em casos atípicos da doença (Blavier *et al.*, 2001).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* realizada na altura em que o Dr. Apolinário efectuou o diagnóstico de LCan, com o kit Speed Leish, deu resultado positivo, embora a pesquisa efectuada com IFI numa amostra de sangue recolhida na altura em que veio à

consulta, em que não apresentava sinais compatíveis com LCan e se encontrava em tratamento com alopurinol tenha revelado um resultado negativo. Neste caso, a remissão completa dos sintomas, alcançada com o tratamento, foi acompanhada da diminuição da titulação de anticorpos anti-leishmania com observação de seroconversão e obtenção de um resultado negativo no teste de IFI (Miró *et al.*, 2008).

As análises laboratoriais revelaram uma trombocitopénia severa (Cortese *et al.*, 2008; Font, 2000; Terrazzano *et al.*, 2006).

O cão número 16, um macho de 29 kg da raça Perdigreiro Português, com cinco anos de idade é um dos cães de caça (Leontides *et al.*, 2002) dum proprietário que reside no Concelho de Penamacor. Num estudo efectuado na Beira Interior e Alentejo foi descoberta uma seroprevalência de LCan em 34% das raposas capturadas. As raposas capturadas em Penamacor não tinham LCan, contrariamente a quatro das catorze raposas capturadas no concelho vizinho do Sabugal (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003) Mesmo quando não caçava, este animal passava a maior parte do tempo ao ar livre.

Neste caso, o estímulo iatrotrópico foi uma úlcera infectada incoercível no prepúcio que teria eventualmente sido causada por uma mordedura de insecto. Estava a ser tratada havia cerca de quatro meses, período durante o qual o animal já tinha sido visto e medicado por dois Médicos Veterinários.

O exame físico revelou uma postite com infecção que abrangia três quartos da circunferência total do prepúcio contígua à junção muco-cutânea (Diniz *et al.*, 2005), revelou também onicogrifose e aumento dos linfonodos poplíteos.

A pesquisa de anticorpos anti-Leishmania deu resultados positivos no kit *Speed® Leish* e no teste de IFI.

As análises laboratoriais efectuadas não revelaram alterações fora dos valores de referência.

Os resultados da pesquisa de anticorpos, o quadro clínico e a história deste caso são indicadores muito fortes de um caso de LCan (Pereira da Fonseca *et al.*, 2003; Diniz *et al.*, 2005; Roze, 2005).

O cão número 17, um macho adulto com 25 kg, de raça e idade indeterminada, era um animal errante que foi adoptado por um abrigo de animais do Concelho de Figueiró dos Vinhos.

Este animal tinha história de caquécia, letargia e alopecia. O exame físico revelou onicogrifose, seborreia seca, linfonodos poplíteos aumentados, placas alopécicas generalizadas e mucosas pálidas, tudo sinais descritos por vários autores em casos de

LCan (Amusategui *et al.*, 2003; Ciaramella & Corona, 2003a; Roze, 2005; Pereira Fonseca & Villa de Brito, 2009; Baneth, 2009e)

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* com os testes *Speed® Leish* e IFI deu em ambos os casos resultados positivos (Gomes *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008).

As análises laboratoriais revelaram valores séricos de BUN, Creatinina acima do intervalo de referência e hiperfosfatemia, alterações típicas de IRC decorrente de LCan (Costa *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2007).

O cão número 18, um macho de 28 kg, de raça indeterminada, com quatro anos de idade pertencia a um proprietário do Concelho de Vila de Rei que o mantinha permanentemente no exterior sua habitação.

Este exemplar foi levado à consulta por causa de história de prurido, lesões cutâneas e orais.

Ao exame físico foram detectadas lesões pruriginosas generalizadas de dermatite alopecica em forma de círculos, mais concentradas nos membros. Algumas destas lesões apresentavam-se já ulceradas. Puderam-se observar ainda linfonodos poplíteos aumentados de tamanho, úlceras orais e conjuntivite (Brito *et al.*, 2006).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* deu resultados positivos em ambos os testes efectuados neste estudo e as análises laboratoriais revelaram hiperglobulinemia, segundo alguns autores, a alteração laboratorial mais frequente em casos de LCan (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2009).

Alguns dos sinais exibidos por este caso não são frequentes na LCan, como o prurido e as lesões alopecicas circulares bastante bem definidas. Estas lesões são frequentemente descritas em casos de dermatite fungica embora não tenha sido efectuado o diagnóstico etiológico nem existam dados da resposta ao tratamento, no entanto, este caso pode ser outro exemplo de infecção concomitante, em que a imunossupressão causada pela LCan facilita a infecção por outros microrganismos (Baneth, 2009c).

O cão número 19, uma fêmea de 7 kg, da raça Podengo Anão, com cinco anos de idade, era um cão de caça e passava o tempo no exterior numa habitação no Concelho da Sertã.

Neste estudo, este animal tem a particularidade de ter sido o único ao qual não se efectuou a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* com o kit *Speed® Leish*, por não ter sido levado à consulta.

No entanto o quadro exuberante com história de letargia e alopecia e sinais de linfadenopatia, úlceras cutâneas, hiperqueratose, onicogribose, seborreia e conjuntivite (Baneth, 2009e; Brito *et al.*, 2006), levaram o autor a recolher uma amostra de sangue para

a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* com o teste de IFI. O resultado do teste de IFI foi positivo (Gomes *et al.*, 2008).

O cão número 20, um macho com 47 kg, de raça indeterminada, com 3 anos de idade era guarda de uma das maiores explorações de ovinos da Zona do Pinhal, um local onde havia reservatórios de água artificiais e onde este co-habitava com uma cadela que tinha LCan havia mais de uma década. Este cão habitava num meio onde existiam pelo menos dois factores de risco importantes para a infecção com *L. infantum*, locais propícios ao desenvolvimento do vector e um cão com LCan (Afonso *et al.*, 2005; Dujardin, *et al.*, 2008).

Foi levado à consulta por causa de uma história de letargia e anorexia.

Ao exame físico foi detectável aumento do tamanho do linfonodo poplíteo esquerdo em relação ao direito (Roze, 2005; Ciaramella & Corona, 2003a).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* deu resultados positivos em ambos os testes realizados (Gomes *et al.*, 2008).

As análises laboratoriais efectuadas revelaram leucocitose com granulocitose, neutrofilia e eosinofilia (Garcia *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2006).

O cão número 21, um macho com 14 kg, de raça indeterminada e 12 anos de idade, habitava no exterior numa habitação no Concelho da Sertã e sofria de LCan que lhe havia sido diagnosticada quatro anos antes.

O estímulo iatrotópico na altura em que o autor teve contacto com este animal, foi a história de anorexia, vômito e letargia. O exame físico revelou mucosas pálidas, linfadenopatia generalizada, perda de peso e halitose urémica, sinais clínicos compatíveis com LCan (Baneth, 2009e; Roze, 2005; Amusatogui *et al.*, 2003).

A pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* realizada na altura do diagnóstico com o *kit Speed® Leish*, deu resultado positivo, embora a pesquisa realizada à amostra de sangue recolhida na altura da consulta acompanhada pelo autor, com o teste de IFI, tenha dado um resultado negativo. Esta é situação muito rara, quando infectados e sintomáticos, apenas 5% dos cães com LCan são seronegativos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2009).

As análises laboratoriais revelaram valores séricos acima do intervalo referência de BUN, Creatinina, hiperfosfatémia e anemia, alterações frequentemente descritas em casos de LCan (Reis *et al.*, 2006; Font, 2000).

O cão número 22, uma fêmea de 19 kg, de raça e idade indeterminada e hábitos errantes, foi acolhido por um abrigo no Concelho da Sertã.

O estímulo iatrotrópico foi a perda de peso súbita sem anorexia e a claudicação (Santos *et al.*, 2006; Giménez & Menéndez, 2005; Souza *et al.*, 2005).

Ao exame físico o animal manifestou dor quando se efectuou o exame do sistema músculo-esquelético, observou-se caquécia, linfadenopatia generalizada e úlceras orais localizadas nos bordos labiais, sinais clínicos de LCan (Baneth *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2006) e registou-se uma temperatura rectal de 39,5 °C.

A pesquisa de anticorpos anti-Leishmania revelou resultados positivos em ambos os testes realizados (Gomes *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008).

As alterações laboratoriais observadas neste animal foram a eosinofilia e a trombocitopenia, alterações laboratoriais descritas por vários autores em casos de LCan (Reis *et al.*, 2006; Terrazzano *et al.*, 2006; Cortese *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2008).

5. Conclusão

Este trabalho é o resultado de aproximadamente três meses de estágio durante o qual o autor teve a oportunidade de contactar com a realidade da Clínica Veterinária de Animais de Companhia e também com a realidade da Clínica Veterinária de Espécies Pecuárias da Beira Interior, mais particularmente da Zona do Pinhal.

A maior parte da casuística Clínica com a qual o autor teve contacto foi constituída por casos sintomáticos de LCan. Os vinte e dois casos aqui retratados, demonstram que existem casos sintomáticos da infecção na população canina desta região, especialmente no Concelho da Sertã.

Este era o objectivo principal do trabalho, tendo sido o autor sensibilizado para esta temática através da aprendizagem feita com o Dr. Francisco Apolinário, há cerca seis anos, sobre as manifestações clínicas que mais frequentemente acompanham esta doença, pela posterior experiência da observação de inúmeros casos desta doença na região, que é de facto a região de onde o autor é natural e também mas não menos importante, pelo facto de o autor ter já presenciado e tentado lutar contra três casos fatais de LCan em cães seus.

Para que se possam apurar os valores reais da prevalência da infecção na Zona do Pinhal, são necessários trabalhos com amostras mais numerosas e períodos de estudo mais alargados.

Para asseverar que o ciclo de transmissão se completa na Zona do Pinhal, é necessária a realização de trabalhos que englobem a captura de flebótomos infectados com *L. infantum* e que a capacidade infectante destes vectores para os hospedeiros susceptíveis seja comprovada. Este tipo de trabalhos pode demonstrar-se útil, visto que teoricamente existem nesta região condições favoráveis para o desenvolvimento do vector e vários casos

sintomáticos da infecção e por ser urgente adoptar medidas que impeçam que o ciclo se complete, na eventualidade de se vir a comprovar que este realmente se consuma.

Tais medidas tomam especial urgência quando acaba de ser inaugurado o primeiro canil comum aos cinco concelhos da Zona do Pinhal, localizado em Proença-a-Nova, porque como é explícito na revisão bibliográfica, as densidades elevadas de cães em recintos onde não existem meios para bloquear o ciclo de transmissão, são um factor preponderante para o rápido aumento do número de cães infectados.

Este trabalho tem também como objectivo secundário, mas não menos importante, o intuito de alertar sobre o perigo que a LCan representa para a Saúde Pública e o risco que um cão infectado numa região endémica representa, se não forem tomadas as medidas preventivas adequadas.

Esta é uma acção que urge ser tomada face à falta de conhecimento demonstrada pelos donos dos animais de estimação infectados, reflectida na ausência de qualquer tipo de protecção insecticida ou repelente nos animais consultados durante o estágio, aos quais foi diagnosticada LCan.

A probabilidade de um ser humano ser infectado, quando numa região endémica, é substancialmente menor quando se compara essa probabilidade para um cão e é verdade que o organismo humano lida com infecção por *L. infantum* dum modo mais eficaz que organismo canino, todavia, não são os jovens e adultos saudáveis os indivíduos que correm maior risco de desenvolver LV. São os indivíduos mas debilitados, quer seja por motivo de doença quer seja derivado ao desgaste da idade e aqueles nos quais o sistema imunitário ainda não está suficientemente desenvolvido, como as pessoas infectadas com o VIH e idosos e as crianças, respectivamente, que correm maior risco de vida quando são infectadas com *L. infantum*.

Como aspirante a Médico Veterinário e por se sentir responsável pela Saúde Pública em geral, especialmente pela dos que lhe estão mais próximos e não menos pela saúde dos nossos animais, o autor não podia ignorar uma realidade que lhe havia sido já relatada há cerca de seis anos pelo Doutor Francisco Apolinário. Realidade essa, que actualmente tem sido alvo do interesse de tantos Veterinários em Portugal e no Mundo, provocou no autor a necessidade de realizar um trabalho, que não mostra mais do que ponta do *iceberg* da problemática da LCan, numa região que por vezes parece ficar um pouco esquecida dentro do panorama nacional, mas que reúne informação actual e que pode ser útil para os habitantes da Zona do Pinhal.

6. Bibliografia

Afonso, M. O., Campino, L., Cortes, S., & Alves-Pires, C. (2005). The phlebotomine sandflies of Portugal. XIII - Occurrence of *Phlebotomus sergenti* Parrot, 1917 in the Arrabida leishmaniasis focus. *Parasite*, vol. 12, nº 1, pp 69-72.

Amusategui, I., Sainz, A., Rodríguez, F., & Tesouro, M. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, 18, 147-156.

Ayali, D., Jaffe, C., Burshtain, O., Gonen, L., & Baneth, G. (2004). Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 1727-1733.

Baneth, G. (2009a). Canine and feline hepatozoonosis. *18º Congresso da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia* (pp. 1-5). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G. (2009b). Canine ehrlichiosis - a silent killer. *18º Congresso da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia* (pp. 1-4). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G. (2009c). Canine vector-borne co-infections - the impact of concurrent diseases. *18º Congresso da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia* (pp. 1-3). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G. (2009d). Dirofilariosis - an update. *18º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia*. (pp. 1-4). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G. (2009e). The pathogenesis and epidemiology of canine leishmaniosis and an update on the diagnosis, treatment and prevention. *18º Congresso Nacional da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia* (pp. 1-5). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G. (2009f). Update on canine babesiosis. *18º Congresso da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia* (pp. 1-7). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Baneth, G., & Shaw, S. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* , 106, 315-324.

Baneth, G., Koutinas, A. F., Gallego, L. S., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* , 24, 324-330.

Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Thollot, I., Chabanne, L., Cadoré, J. L., et al. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* , 162, 108-120.

Brito, F. L., Alves, L. C., Maia, F. C., Santos, E. S., Laus, J. L., & Meunier, I. M. (2006). Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* , 58, 768-775.

Campino, L., Bajanca, R., Franca, I., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Fiadeiro, T. (2005). Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania infantum* zimodeme mon-1 em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* , 18, 475-478.

Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J., Gomes, G., Pires, C., et al. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine and International Health* , 11, 1708-1714.

Campino, L., Cardoso, L., Villa de Brito, T., Carvalho, L., & Neves, R. (2008) *Epidemiologia da Leishmaniose Canina*. Obtido em 27, de Maio de 2009 de Onleish - Observatório Nacional das Leishmanioses: <http://www.onleish.org/index.php?article=9&visual=3>

Cardoso, L. M. (2004). *Estudos de infecção canina por Leishmania no Alto Douro*. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro.

Cardoso, L., Santos, H., Silva, A. C., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Rodrigues, M. (2002). *Leishmania infantum* mon-98: infection in a dog from Alto Douro. *Acta Tropica* , 83, 83-85.

Ciaramella, P., & Corona, M. (2003a). Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium* , 25, 358-359.

Ciaramella, P., & Corona, M. (2003b). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. *Compendium* , 25, 370-375.

- Coler, R., Goto, Y., Bogatzki, L., Raman, V., & Reed, S. (2007). Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of cd4+ t cells. *Infection and Immunity* , 75, 4648-4654.
- Cortes, S., Afonso, M., Pires, C., & Campino, L. (Setembro de 2007). Stray dogs and leishmaniasis in urban areas, Portugal. *Emerging Infectious Diseases* , 13, 1431-1432.
- Cortese, L., Pelagalli, A., Piantedosi, D., Mastellone, V., Loria, A., Lombardi, P., et al. (2008). The effects of prednisone on haemostasis in leishmaniotic dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal* , 177, 405-410.
- Costa-Durão, J.F., Rebelo, E., Peleteiro, M.C., Correia, J.J., Simões, G. (1994) Primeiro caso de leishmaniose em gato doméstico (*Felis catus domesticus*) detectado em Portugal (Concelho de Sesimbra): Nota preliminar. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* , 89, 140-144.
- Costa, F., Goto, H., Saldanha, L., Silva, S., Sinhorini, I., Silva, T., et al. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* , 40, 677-684.
- Coutinho, M. T., & Linardi, P. M. (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Veterinary Parasitology* , 147, 320–325.
- Coutinho, M. T., Bueno, L. L., Sterzik, A., Fujiwara, R. T., Botelho, J. R., Genaro, M. M., et al. (2004). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (acar: ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* , 128, 149-155.
- Day, M. J. (2007). Immunoglobulin g subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology* , 147, 2-8.
- Diniz, S. A., Melo, M. S., Borges, A. M., Bueno, R., Reis, B. P., Tafuri, W. L., et al. (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinary Pathology* , 42, 650-658.
- Dipineto, L., Manna, L., Baiano, A., Gala, M., Fioretti, A., Gravino, A., et al. (2007). Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. *Journal of Wildlife Diseases* , 43, 518-520.

Dujardin, J. C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J. P., Grandoni, L., Soteriadou, K., et al. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, nº 7, pp. 1013-1018.

Ettinger, S., & Feldman, E. (1992). *Tratado de medicina veterinária: moléstias do cão e do gato*. (3ª Edição). (pp.290-294; 300-304). São Paulo: Editora Manole LTDA.

Faria, T. P. (2008). *Estudo sero-epidemiológico da infecção por Leishmania infantum em cães e gatos do município de Vila Franca de Xira (Ribatejo, Portugal) utilizando o teste de imunofluorescência indirecta*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa: Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, 123 pp.

Félix, N., Mouro, S., Vilela, C., Peleteiro, M., Ferreira, A., & Niza, M. (2008). Canine leishmaniasis with nephrotic syndrome and aortic and caudal vena cava thromboembolism. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 18, 526-531.

Font, A. (2000). Leishmaniosis canina. *I Congresso do Hospital Veterinário do Porto* (pp. 91-95). Porto: Pfizer.

Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., et al. (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 37-45.

Garcia, F. A., Lopes, R. S., Ciarlini, P. C., Marques, F. J., Lima, V. M., Perri, S. H., et al. (2007). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, 83, 105-108.

Garcia, F., Ciarlini, P., Lopes, R., Marques, F., Bomfim, S., Lima, V., et al. (2008). Hematological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science*, 45, 68-74.

Gimenéz, A. A., & Menéndez, N. C. (Setembro de 2005). Modelos radiográficos de las lesiones óseas y articulares en la leishmaniosis canina. *Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España*, pp. 34-38.

Gomes, Y. M., Cavalcanti, M. P., Lira, R. A., Abath, F. G., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *The Veterinary Journal*, 175, 45-52.

- Graham, A., Cattadori, I., Smith, J., Ferrari, M., & Bjornstad, O. (2007). Transmission consequences of coinfection: cytokines writ large? *Trends in Parasitology* , 23, 284-291.
- Grandoni, L., Manzillo, V., Pagano, A., Piantedosi, D., Luna, R., Gramiccia, M., et al. (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* , 23, 5245-5251.
- Iniesta, L., Gallego, M., & Portús, M. (2005). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis . *Veterinary Immunology and Immunopathology* , vol 103, pp 77-81.
- Lemesre, J., Holzmüller, P., Gonçalves, R., Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Cavaleira, M., et al. (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine* , 25, 4223-4234.
- Leontides, L., Saridomichelakis, M., Billinis, C., Kontos, V., Koutinas, A., Galatos, A., et al. (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Veterinary Parasitology* , 109, 19-27.
- Lima, V., Ikeda, F., Rossi, C., Feitosa, M., Vasconcelos, R., Munari, D., et al. (2009). Leishimune vaccine-induced immune response in dogs from an endemic area of visceral leishmaniasis. *Journal of Veterinary Immunology and Immunopathology* , 128, 302.
- Maia, C., Afonso, M., Neto, L., Dionísio, L., & Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Phlebotomus perniciosus* from Algarve region, Portugal. *Vector Borne Diseases Journal* , vol.46, pp 268-272.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L., & Gravino, A. (2008). Real-time PCR assay in *leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The Veterinary Journal* , 177, 279-282.
- Marques, C., Carneiro, M., Pereira, M., Jorge, J., Cruz, M., & Santos-Gomes, G. (2008). Efficacy of the liposome trifluralin in the treatment of experimental canine leishmaniosis. *The Veterinary Journal* , 178, 133-137.
- Marques, M. I. (2008). *Leishmaniose canina*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa: Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 151 pp.

Mekuzas, Y., Grandoni, L., Oliva, G., Foglia Manzillo, Z., & Baneth, G. (2009). Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs. *Clinical Microbiology and Infection* .

Miller, W. (2009). Lupus in 2009: the many faces of cutaneous lupus erythematosus. 18^o Congresso da Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia (pp. 1-3). Lisboa: Associação Portuguesa de Médicos Veterinários Especialistas em Animais de Companhia.

Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population. *Research in Veterinary Science* , 85, 35-38.

Miró, G. (Setembro de 2005). Manejo clínico de la leishmaniosis canina: podemos unificar criterios? *Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España* , pp. 44-48.

Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis - part two. *Trends in parasitology* , 371-377.

Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., et al. (2007). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Research in Parasitology* , 101, 253-257.

Moraitou, K. K., Rallis, T. S., Koutinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., & Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *American Journal of Tropical Medicine and Higiene* , 76, 53-57.

Mozos, E., Pérez, J., Day, M., Lucena, R., & Ginel, P. (1999). Leishmaniosis and generalized demodicosis in three dogs: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Journal of Comparative Pathology* , 120, 257-268.

Noli, C., & Auxilia, S. (2005). Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology* , 16, 213-232.

Ochoa, P., Castillo, J., Gascón, M., Zarate, J., Alvarez, F., & Couto, C. (2009). Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *The Veterinary Journal* , 179, 259-263.

Oliva, G., Scalone, A., Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Muccio, T., et al. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological,

serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology* , 44, 1318-1322.

Otranto, D., & Dantas-Torres, F. (2008). Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. *Veterinary Parasitology* , doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.016.

Otranto, D., Paradies, P., Lia, R., Latrofa, M., Testini, G., Cantacessi, C., et al. (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Veterinary Parasitology* , 144, 270-278.

Pasa, S., Toz, S., Voyvoda, H., & Ozbel, Y. (2005). Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology* , 128, 243-249.

Pennisi, M. G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F., & Del Maso, R. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Records* , vol. 12, nº 156, 346-349.

Pereira da Fonseca, I. M., Cortes, S., Magalhães, A., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J. A., Santos-Gomes, G. M., et al. (2003). *Prevalência de Leishmania spp. em Raposas Vermelhas (Vulpes vulpes silacea, Miller, 1907) em Portugal*. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Pereira da Fonseca, I., & Villa de Brito, M. (2009). Diagnóstico. In G. Santos Gomes, & I. Pereira Fonseca, *Leishmaniose canina* (pp. 83-91). Lisboa: Merial.

Pinhão, C. P. (2009). *Leishmaniose canina - estudo de 158 casos da região de Lisboa*. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa: Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, 55 pp.

Poot, J., Spreeuwenberg, K., Sanderson, S., Schijns, V., Mottram, J., Coombs, G., et al. (2006). Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with *Leishmania infantum*. *Vaccine* , 24, 2460-2468.

Quinnell, R., Courtenay, O., Garcez, L., Kaye, P., Shaw, M., Dye, C., et al. (2003). IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , vol. 91, pp 161-168.

Ramiro, M., Zárate, J., Hanke, T., Rodriguez, D., Esteban, M., Lucientes, J., et al. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved

by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing lack. *Vaccine* , 21, 2474-2484.

Ready, P. D. (2008). Leishmaniasis emergence and climate change. *Revue Scientifique et Technique Office Internationale des Épizooties* , 27, 399-412.

Reis, A., Filho, O., Carvalho, A., Carvalho, M., Mayrink, W., Silva, J., et al. (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science* , 81, 68-75.

Reithinger, R., Coleman, P., Alexander, B., Vieira, E., Assis, G., & Davies, C. (2004). Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *International Journal for Parasitology* , 34, 55-62.

Ribeiro, R., Moura, E., Pimentel, V., Sampaio, W., Silva, S., Schettini, D., et al. (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 52, 2564-2572.

Roze, M. (2005). Canine leishmaniasis. A spreading disease. Diagnosis and treatment. *European Journal of Companion Animal Practice* , 15, 39-52.

Santos, M., Marcos, R., Assunção, M., & Matos, A. (2006). Polyarthritis associated with visceral leishmaniasis in a juvenile dog. *Veterinary Parasitology* , 141, 240-244.

Saridomichelakis, M., Mylonakis, M., Leontides, L., Koutinas, A., Billinis, C., & Kontos, V. (2005a). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 130, 82-86.

Saridomichelakis, M., Mylonakis, M., Leontides, L., Billinis, C., Koutinas, A., Galatos, A., et al. (2005b). Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*) in the endemic areas. *Veterinary Parasitology* , 73, 199-205.

Sauquillo, M. C. (Setembro de 2005). Manifestaciones oculares en la leishmaniosis canina. *Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España* , pp. 39-43.

- Semião-Santos, S., Harith, A., Ferreira, E., Alves-Pires, C., Sousa, C., & Gusmão, R. (1995). Evora district as a new focus of canine leishmaniosis in Portugal. *Research in Parasitology* , vol.81 235-239.
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., et al. (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* , 155, 198-203.
- Souza, A. I., Juliano, R. S., Gomes, T. S., Diniz, S. A., Tafuri, W. L., Borges, A. M., et al. (2005). Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary Parasitology* , 129, 51-54.
- Spath, G., Garraway, L., Turco, S., & Beverley, S. (2003). The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America* , vol. 100, nº16, pp 9536–9541.
- Terrazzano, G., Cortese, L., Piantedosi, D., Zappacosta, S., Loria, A., Santoro, D., et al. (2006). Presence of anti-platelet igm and igg antibodies in dogs naturally infectes by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 110, 331-337.
- Teske, E., Knapen, F., Beijer, E., & Slappendel, R. (2002). Risk of Infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Scandinavian Veterinary Acta* , 43, 195-201.
- Torres, F. (2006). Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Veterinary Parasitology* , 141, 1-8.
- Vouldoukis, I., Drapier, J., Nussler, A., Tselentis, I., Silva, O., Gentilini, M., et al. (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy Induces macrophage antileishmanial activity via the l-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 40, 253-256.
- Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A., & Médaille, C. (2006). Clinical efficacy of a miltefosine oral solution in the treatment of canine leishmaniosis. *31st World Small Animal Veterinary Congress* (pp. 11-14). Praga: Virbac.